



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**“Caracterización fisiológica y genómica de dos cepas
nativas del género *Shewanella* con potencial
biodegradador de colorantes azoicos”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

AUTOR

Ivette Alejandra FUENTES QUISPE

ASESOR

Pablo Sergio RAMÍREZ ROCA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Fuentes, I. (2019). *Caracterización fisiológica y genómica de dos cepas nativas del género Shewanella con potencial biodegradador de colorantes azoicos*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

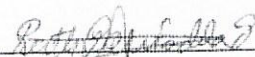
Siendo las 16:15 horas del 10 de abril de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga de **IVETTE ALEJANDRA FUENTES QUISPE**.


Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 001-EPMP-2019, el titulando expuso su tesis: **"CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y GENÓMICA DE DOS CEPAS NATIVAS DEL GÉNERO *Shewanella* CON POTENCIAL BIODEGRADADOR DE COLORANTES AZOICOS"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 1.9, calificativo:


Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** a **IVETTE ALEJANDRA FUENTES QUISPE** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

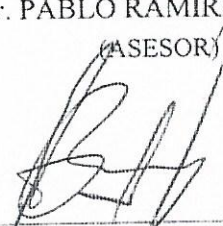
Siendo las horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 10 de abril de 2019.


Mg. RUTH GARCIA DE LA GUARDA
(PRESIDENTA)


Mg. DEBORA ALVARADO IPARRAGUIRRE
(MIEMBRO)


Dr. PABLO RAMIREZ ROCA
(ASESOR)


Mg. TITO SANCHEZ ROJAS
(MIEMBRO)

AGRADECIMIENTOS

A Innóvate Perú con Contrato-188-IB-FINCyT-2013 y al Proyecto VRIP B17100191 “Análisis genómico completo de una cepa bacteriana nativa con capacidad de degradación de colorantes azoicos para su aplicación en biorremediación” a cargo Doctor Pablo Sergio Ramírez Roca, por el financiamiento parcial de esta tesis.

Al fondo del Programa de Promoción de Tesis de Pregrado del Vicerrectorado de investigación (VRI) de la UNMSM, por el co-financiamiento de este estudio.

A la M.Sc. Débora Alvarado Iparraguirre, al Dr. Pablo Ramírez Roca y la M.Sc. Ruth García de la Guarda por abrirme las puertas del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología y brindarme su confianza para colaborar en los proyectos de investigación.

Al Dr. Pablo Ramírez Roca, mi asesor de tesis, por su guía y apoyo para la realización de la presente tesis.

A mis papás, porque a pesar de las dificultades dieron todo para brindarme una buena educación, por motivarme a continuar mejorando. A mis hermanitas, Dodi y Mimi, su existencia alegra mis días.

A Mac Aguirre, Gustavo Mormontoy, Wendy Lizárraga, Karen Orozco y Robert Ccorahua, mis compañeros de laboratorio, por su apoyo y por todos los momentos compartidos en el lab.

A Johan, por brindarme su apoyo, por preocuparse siempre y por tener las palabras indicadas cada vez que atravesé dificultades.

Finalmente, a todos aquellos que de alguna manera hicieron posible la realización de este trabajo.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Aguas residuales textiles	3
2.2 Colorantes azo	4
2.3 Tratamiento de aguas residuales textiles.....	5
2.3.1 Métodos biológicos	6
a) Degradación biológica de colorantes azo por azorreductasas.....	7
b) Degradación de tintes colorante por peroxidasas.....	10
2.4. Secuenciamiento de próxima generación	11
2.4.1. Secuenciamiento por síntesis: Plataforma Illumina	13
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5.1 Obtención de las muestras	16
5.2 Aislamiento de cepas bacterianas	16
5.3 Reactivación de cepas bacterianas	16
5.4 Selección de la longitud de onda máxima para cada colorante	17
5.5 Selección inicial de cepas con potencial biodegradador	17
5.6 Cinética de decoloración de las cepas LC-2 y LC-6.....	17
5.7 Características morfológicas de las cepas LC-2 y LC-6.....	18
5.8 Preparación de DNA genómico para secuenciamiento	18
5.9 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	19
5.10. Secuenciamiento total del genoma de las cepas LC-2 y LC-6	19
5.11. Ensamblaje de los genomas de las cepas LC-2 y LC-6.....	19
5.12. Identificación de las cepas mediante análisis filogenético.....	20
5.13. Identificación de las cepas mediante análisis filogenómico.....	20
5.14. Anotación de los genomas de <i>Shewanella</i> sp. LC-2 y LC-6.....	21
6. RESULTADOS	
6.1. Obtención de cepas bacterianas a partir de efluentes	22
6.2. Selección de longitud de onda máxima para cada colorante	22
6.3. Selección de cepas con potencial biodegradador	24
6.4. Cinéticas de decoloración por cepas LC-2 y LC-6	27
6.5. Características morfológicas de las cepas seleccionadas	31

6.6.	Extracción de DNA genómico de las cepas LC-2 y LC-6	33
6.7.	Análisis filogenético de las cepas seleccionadas	34
6.8.	Análisis filogenómico de las cepas seleccionadas	35
6.9.	Análisis del genoma de <i>Shewanella</i> sp. LC-2 y LC-6.....	36
7.	DISCUSIÓN	45
8.	CONCLUSIONES	51
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Decoloración de diversos colorantes azo por cepas bacterianas productoras de azorreductasas.....	8
Tabla 2. Comparación de Tecnologías NGS.....	12
Tabla 3. Características culturales de los aislados en medio CASO	22
Tabla 4. Decoloración de Azul Directo 71, Rojo Remazol RGB y Amarillo Remazol RGB por el método de microplacas.....	26
Tabla 5. Decoloración de tintes textiles en condiciones estáticas a 30°C	27
Tabla 6. Parámetros y estadísticos del ensamblaje de los genomas de <i>Shewanella</i> sp. LC-6 y LC-2.....	36
Tabla 7. Comparación de las características del genoma de <i>Shewanella</i> sp. LC-2, <i>Shewanella</i> sp. LC-6 con los de: <i>Shewanella</i> sp. FDAARGOS_354 y ANA-3.....	38
Tabla 8. Anotación de genes relacionados al metabolismo de colorantes azo en el genoma de <i>Shewanella</i> sp. LC-2.....	43
Tabla 9. Anotación de genes relacionados al metabolismo de colorantes azo en el genoma de <i>Shewanella</i> sp. LC-6.....	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 01. Contaminantes generados a cada nivel del procesamiento textil	1
Figura 02. Estructura del colorante azo Azul Directo 71	2
Figura 03. Mecanismo de azorreductasa propuesto para la degradación del colorante azo amaranto	9
Figura 04. Flujo de trabajo para secuenciamiento por Illumina	14
Figura 05. Obtención del λ máx de Amarillo Remazol RGB a 100 ppm	23
Figura 06. Obtención del λ máx de Rojo Remazol RGB a 100 ppm.....	23
Figura 07. Obtención del λ máx de Azul directo 71 a 100 ppm	24
Figura 08. Decoloración en microplaca por cepas bacterianas en medio ZZ suplementado con Azul directo 71, Rojo remazol RGB y Amarillo Oro Remazol RGB después de 24 horas de incubación	25
Figura 09. Cinética de decoloración de la cepa LC-2 en el medio ZZ suplementado con Azul Directo 71, Rojo Remazol RGB y Amarillo Remazol RGB a 100 ppm de concentración.....	28
Figura 10. Proceso de decoloración de Amarillo Remazol RGB por la cepa LC-2 en Medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.	28
Figura 11. Proceso de decoloración de Rojo Remazol RGB por la cepa LC-2 en Medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.....	29
Figura 12. Proceso de decoloración de Azul Directo 71 por la cepa LC-2 en Medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante	29
Figura 13. Cinética de decoloración de la cepa LC-6 en el medio ZZ suplementado con Azul Directo 71, Rojo Remazol RGB y Amarillo Remazol RGB a 100 ppm de concentración.....	30
Figura 14. Coloración Gram de las cepas seleccionadas	31
Figura 15. Colonias en placa de las cepas LC-2 y LC-6 en Agar CASO a las 24 horas	32

Figura 16. Integridad del DNA de las cepas LC-2 y LC-6 analizadas en un gel de agarosa al 1%	33
Figura 17. Árbol filogenético de <i>Shewanella</i> spp. basado en los genes <i>gyrB</i> y <i>rpoB</i> ..	34
Figura 18. Árbol filogenómico basado en el contenido diferencial de 10 genomas de <i>Shewanella</i> incluyendo las cepas LC-2 y LC-6.....	35
Figura 19. Alineamiento circular de genomas de <i>Shewanella</i> sp. FDAARGOS_354, <i>Shewanella</i> sp. LC-2 y <i>Shewanella</i> sp. LC-6.....	37
Figura 20. Alineamiento del operón de la azorreductasa putativa de <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 y <i>Shewanella</i> sp. LC-2.....	39
Figura 21. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de FMN azorreductasa dependiente de NADH	40
Figura 22. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de peroxidasas decolorante de tintes (DyPs)	42
Figura S1. Longitud acumulativa de contigs de <i>Shewanella</i> sp. LC-6.....	59
Figura S2. Cantidad de Guanina y Citosina (GC) en el genoma de <i>Shewanella</i> sp. LC-6.....	59
Figura S3. Longitud acumulativa de contigs de <i>Shewanella</i> sp. LC-2.....	60
Figura S4. Cantidad de Guanina y Citosina (GC) en el genoma de <i>Shewanella</i> sp. LC-2.....	60

RESUMEN

La industria textil libera al ambiente grandes cantidades de aguas residuales que, entre otros varios contaminantes, contienen colorantes azo en su composición, los cuales son compuestos tóxicos, carcinogénicos y mutagénicos que afectan negativamente la vida acuática y la calidad del agua. El presente estudio tuvo por objetivo caracterizar a nivel fisiológico y genómico cepas nativas con potencial de degradación de colorantes azo obtenidas de un efluente de industria textil de Lima, Perú. Se aplicó el método de la microplaca a doce aislados bacterianos para su selección en base a su respuesta positiva a la decoloración de tres colorantes azo: Azul directo 71, Rojo remazol RGB y Amarillo Oro Remazol RGB. La actividad decolorante de las cepas seleccionadas fue evaluada mediante espectrofotometría UV-Visible en medio ZZ con el colorante respectivo a 100 ppm y en condiciones de microaerofilia durante 24 horas. El secuenciamiento de los genomas se realizó utilizando la tecnología HiSeq 2500 de Illumina, el ensamblaje de novo con el software SPAdes, la extensión de los contigs y reparación de gaps a través de los programas ABACAS e IMAGE y la anotación con Prokka. Las dos cepas con mejor eficiencia de degradación correspondieron a *Shewanella* sp. LC-2 y *Shewanella* sp. LC-6, ambas identificadas mediante análisis filogenómico resultando muy cercanas al grupo filogenético de *Shewanella* sp. FDAARGOS_354. Las cepas mostraron una actividad decolorante frente a Azul Directo 71, Rojo Remazol y Amarillo Remazol con porcentajes de 94.42, 94.79, 91.67 para *Shewanella* sp. LC-2 y 94.37, 94.92, 83.24 para *Shewanella* sp. LC-6 a las 24 h. Asimismo, los genomas de *Shewanella* sp. LC-2 y LC-6 revelaron la presencia de genes que codifican azorreductasas dependientes de NADH, peroxidasas decoloradoras de tinte (DyPs), genes implicados en la desaminación, asimilación de sulfatos, reducción de nitratos y metales pesados, como también en la degradación de benzoatos, catecol y gentisato. Se concluye que las cepas *Shewanella* LC-2 y LC-6 tienen una actividad metabólica eficaz para la decoloración de Azul directo 71, Rojo remazol RGB y Amarillo

Oro Remazol RGB, presentan versatilidad catabólica y son de potencial aplicación en la biorremediación de aguas residuales textiles.

Palabras clave: Biodegradación, *Shewanella* sp., colorante azo, decoloración, azorreductasa, peroxidasa.

ABSTRACT

The textile industry releases large amounts of wastewater into the environment, which among other pollutants contains azo dyes in its composition, which are toxic, carcinogenic and mutagenic compounds that adversely affect aquatic life and water quality. The objective of the present study was to characterize, at the physiological and genomic level, native strains with the potential for degradation of azo dyes obtained from an effluent in a textile industry of Lima, Peru. A microplate method was applied to twelve bacterial isolates for selection based on their positive response to the discoloration of three azo dyes: Direct Blue, Remazole Red and Remazole Yellow. The decolorizing activity of the selected strains was evaluated by UV-Visible spectrophotometry in ZZ medium with the respective dye at 100 ppm and under microaerophilic conditions for 24 hours. Genome sequencing was performed using Illumina's HiSeq 2500 technology, de novo assembly with the SPAdes software, extension of the contigs and gaps repair through the ABACAS and IMAGE programs and the annotation with Prokka. Two strains with the best degradation efficiency corresponded to *Shewanella* sp. LC-2 and *Shewanella* sp. LC-6, both identified by phylogenomic analysis, resulting very close to the phylogenetic group of *Shewanella* sp. FDAARGOS_354. *Shewanella* sp. LC-2 showed a decolorizing activity against Direct Blue, Red Remazole and Yellow Remazole with percentages of 94.42, 94.79, and 91.67, respectively, while *Shewanella* sp. LC-6 showed decolorizing activities of 94.37, 94.92 and 83.24% for the same dyes. Additionally, the genomes of *Shewanella* sp. LC-2 and LC-6 revealed the presence of genes that encode azoreductases dependent on NADH, Dye-decolorizing Peroxidase (DyP), genes involved in deamination, assimilation of sulfates, reduction of nitrates and heavy metals, as well as the degradation of benzoates, catechol and gentisate. It is concluded that the strains *Shewanella* LC-2 and LC-6 have an effective metabolic activity for the decolorization of Direct Blue 71, Red Remainder RGB and Yellow Gold Remazol

RGB, have catabolic versatility and are of potential use in bioremediation of textile wastewater.

Keywords: Biodegradation, *Shewanella* sp., azo dye, decoloration, azoreductase, peroxidase.

1. INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales liberadas al medio ambiente por las industrias textiles contienen, entre otros, varios contaminantes colorantes en su composición. La incorrecta eliminación de estos efluentes afecta la transparencia y solubilidad del oxígeno en los cuerpos de agua, generando efectos tóxicos agudos sobre la flora y fauna acuática y causando graves problemas ambientales (Solis *et al.*, 2012).

Dentro de todos los colorantes sintéticos disponibles, los colorantes azoicos conforman el mayor grupo de colorantes utilizados en la industria textil. Debido a la facilidad y rentabilidad de su síntesis, su estabilidad y variedad, estos llegan a constituir el 60-70% de todos los colorantes producidos (Saratale *et al.*, 2011). Desde el punto de vista ambiental, los colorantes azo son considerados como compuestos xenobióticos electrofílicos resistentes a la degradación y conforman el grupo de colorantes sintéticos más comúnmente liberados al medio ambiente (Zollinger., 1987). Se ha demostrado, además, que pueden ser carcinogénicos y mutagénicos debido a las aminas aromáticas que se generan de la ruptura del enlace azo (Chung *et al.*, 1992; Weisburger *et al.*, 2002), y que sus productos de degradación pueden resultar aún más tóxicos (Brown & De Vito, 1993; Ramsay & Nguyen, 2002).

De manera convencional se utilizan métodos físico-químicos para el tratamiento y remoción del color de dichos efluentes, sin embargo, estos métodos tienen un uso limitado ya que pueden resultar costosos, enfrentarse a problemas operativos y generar una gran cantidad de residuos sólidos, lo cual deriva en una mayor carga contaminante que la de los efluentes y en la producción de subproductos tóxicos (Dönmez y Aksu 2002, Gopi *et al.*, 2012).

En las últimas décadas, la decoloración biológica ha sido utilizada como un método para transformar, degradar o mineralizar colorantes azoicos, convirtiéndose en una alternativa amigable con el medio ambiente y económicamente competitiva a los

procesos de descomposición químicos (Banat *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 2001). Los métodos biológicos son actualmente considerados como específicos, menos intensivos en energía, eficaces y ecológicos al traducirse en una bioconversión parcial o completa de los contaminantes orgánicos hacia productos finales estables y no tóxicos (Khan *et al.*, 2013). Muchas especies de bacterias, levaduras, hongos, algas y actinomicetos tienen la capacidad de adsorber y/o degradar colorantes azoicos (Saratale *et al.*, 2011). Entre estas, las bacterias son los microorganismos aplicados con mayor frecuencia en la degradación de colorantes azoicos, ya que se multiplican rápidamente bajo condiciones aeróbicas, anaeróbicas, facultativas así como en condiciones ambientales extremas como alta salinidad y amplias variaciones en pH y temperatura (Solis *et al.*, 2012).

En la actualidad, las vías metabólicas implicadas en la biodecoloración de aguas residuales textiles aún no han sido completamente elucidadas. Por lo que es necesario apuntar hacia los procesos subyacentes y vías metabólicas identificando genes y metabolitos implicados en el proceso de decoloración (Imran *et al.*, 2015). Así mismo el hallazgo de genes implicados en el proceso de degradación de colorantes permitirá incrementar los conocimientos en estudios de bioaumentación, en los cuales se busca ampliar el conjunto de genes existente en el ambiente introduciendo cepas con gran potencial catabólico (Chandra *et al.*, 2015).

El presente estudio plantea la caracterización a nivel fisiológico y genómico de cepas nativas, a fin de contribuir con un cepario de alto potencial biodegradador de colorantes azoicos, las cuales puedan participar en la remediación de efluentes coloreados liberados al ambiente en grandes cantidades por la industria textil. El análisis genómico permitirá conocer los genes implicados en el metabolismo de colorantes azo a fin de obtener mayor conocimiento sobre el metabolismo de los mismos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. AGUAS RESIDUALES TEXTILES

La industria textil, una de las industrias más importantes a nivel mundial, se ha convertido en una de las principales industrias generadoras de efluentes contaminados debido al manejo inadecuado de las grandes cantidades de agua utilizadas en su proceso de teñido (Pandey *et al.*, 2007). Las aguas residuales textiles contienen compuestos orgánicos, metales pesados y son altamente coloreadas debido a los tintes que contienen en su composición (Wijannarong *et al.*, 2013). Algunas de las etapas del procesamiento húmedo de los textiles junto a los contaminantes generados en cada una de estas se listan en la Figura 01 (Holkar *et al.* 2016).

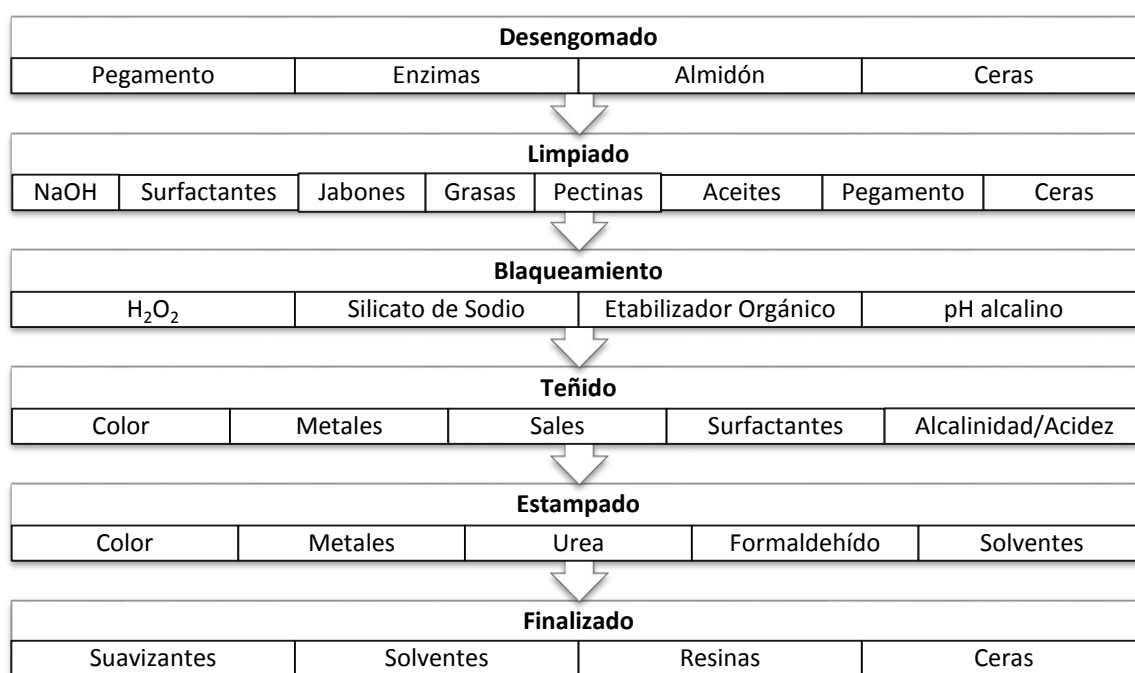


Figura 01. Contaminantes generados a cada nivel del procesamiento textil. Figura adaptada de Holkar *et al.* 2016.

Uno de los primeros contaminantes en ser reconocidos en las aguas residuales textiles es el color y su presencia en cantidades muy pequeñas (menos de 1 ppm para algunos colorantes) es altamente visible (Banat *et al.*, 1996). Existen más de 100000 colorantes disponibles en el mercado con una producción anual de más de 7×10^5 toneladas

métricas de materiales derivados de estos a nivel mundial y se estima que el 5-10% se libera en los efluentes durante el proceso de teñido (Zollinger, 1987). La incorrecta eliminación de estos efluentes afecta la transparencia y solubilidad del oxígeno en los cuerpos de agua, generando efectos tóxicos agudos sobre la flora y fauna acuática y causando graves problemas ambientales (Solis et al 2012).

2.2. COLORANTES AZO

Dentro de todos los colorantes sintéticos disponibles, los colorantes azoicos conforman el mayor grupo de los colorantes utilizados en la industria textil, llegando a constituir el 60-70% de todos los colorantes producidos debido a la facilidad y rentabilidad de su síntesis, su estabilidad y variedad de colores (Saratale *et al.*, 2011). Las concentraciones de colorante azo presentes en las aguas residuales producidas por las industrias textiles puede variar desde 5 a 1500 mgL⁻¹ (Gottlieb *et al.*, 2003). Desde el punto de vista ambiental, los colorantes azo son considerados como compuestos xenobióticos electrofílicos resistentes a la degradación y conforman el grupo de colorantes sintéticos más comúnmente liberados al medio ambiente (Zollinger, 1987). Se ha demostrado además que pueden ser carcinogénicos y mutagénicos debido a las aminas aromáticas que se generan de la ruptura del enlace azo (Chung *et al.*, 1992; Weisburger, 2002) y que sus productos de degradación pueden resultar aún más tóxicos (Brown & De Vito, 1993; Ramsay & Nguyen, 2002).

Su estructura básica incluye un enlace azo (-N=N-) que no se encuentra de forma natural en el medio ambiente, lo que hace que sea difícil degradar. Se agrupan en colorantes monoazo (naranja ácido 52, amarillo reactivo 201, azul disperso 399), colorantes diazo (marrón reactivo 1, marrón 2, negro ácido 1, negro amido), colorantes triazo (azul directo 71, negro directo 19) y colorantes poliazo (rojo directo 80), dependiendo del número de grupos azo presentes en su estructura (Jeong, 2008).

Los colorantes azoicos sulfonados se caracterizan por la presencia de un grupo SO_3H y son encontrados comúnmente en los efluentes industriales.

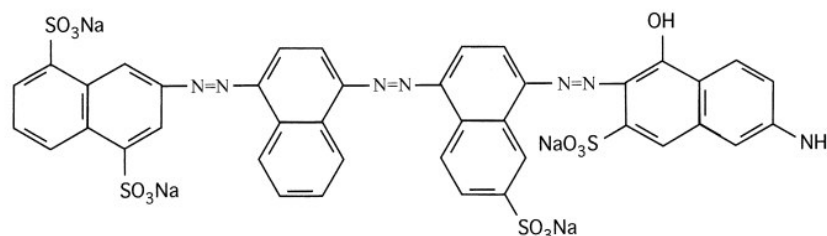


Figura 02. Estructura del colorante azo Azul Directo 71

El diseño estructural y la capacidad de extracción de electrones de los colorantes los hacen altamente resistentes a la luz, a los agentes oxidantes y a las oxidasas microbianas. El número de enlaces azo, el tipo de grupo funcional y la disposición en el compuesto influyen en gran medida en su capacidad de degradación. Por lo tanto, las diferencias en la decoloración por parte de los microorganismos pueden atribuirse a las complejas estructuras del colorante, así como a las condiciones de cultivo y las variaciones genéticas (Rani *et al.*, 2011; Grekova-Vasileva *et al.*, 2009).

2.3. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES TEXTILES

Los colorantes orgánicos textiles deben separarse y eliminarse de los efluentes residuales textiles mediante tratamientos efectivos y viables en plantas de tratamiento de aguas residuales o *in-situ* siguiendo dos conceptos de tratamiento diferentes como: (1) separación de contaminantes orgánicos del ambiente acuático, o (2) la mineralización parcial o completa o la descomposición de contaminantes orgánicos.

De manera convencional se utilizan métodos físico-químicos para el tratamiento y remoción del color de dichos efluentes, los cuales incluyen a la coagulación química, floculación, flotación, precipitación, adsorción, ozonización, fotooxidación, irradiación, ósmosis inversa, intercambio iónico y la filtración de membrana. Sin embargo, estos métodos pueden ser altamente costosos, enfrentarse a problemas operativos y generar

una gran cantidad de residuos sólidos. Por otro lado, la mineralización parcial o completa o descomposición de contaminantes puede ser alcanzada mediante procesos biológicos y químicos (procesos biológicos en conexión con los procesos de lodos activados y biorreactores de membrana, oxidación avanzada con ozono, H₂O₂, UV) (Banat *et al.*, 1996; Srinivasan & Viraraghavan 2010).

2.3.1. Métodos biológicos

Los métodos biológicos para la degradación completa de aguas residuales textiles tienen beneficios como ser respetuosos con el ambiente, tener costos competitivos, producir una menor cantidad de lodos, liberar metabolitos no peligrosos o una mineralización completa y un menor consumo de agua en comparación con los métodos físicos/de oxidación (Hayat *et al.*, 2015). La eficacia de los métodos biológicos para la degradación depende de la adaptabilidad de los microorganismos seleccionados y la actividad de las enzimas. Por lo tanto, se ha aislado y probado una gran cantidad de microorganismos y enzimas para la degradación de varios colorantes. El aislamiento de microorganismos potentes y su uso en la degradación es un aspecto biológico interesante del tratamiento de aguas residuales textiles.

Las bacterias constituyen el grupo de microorganismos que se aplican con mayor frecuencia para la biorremediación de efluentes textiles al ser fáciles de cultivar, de rápido crecimiento en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, además de poder estar adaptadas para sobrevivir en condiciones extremas de salinidad y temperatura, y expresar diferentes tipos de oxidorreductasas. Los intentos de aislar cultivos puros de bacterias capaces de degradar colorantes azoicos se inician desde 1970 con el aislamiento de *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophila* y *Bacillus cereus* (Wuhrmann *et al.*, 1980). Existen varios estudios que describen la decoloración de tintes azo reactivos mediadas por cultivos bacterianos puros como diversas cepas de *Bacillus* spp. con Rojo ácido 119, Azul disperso 79 y Anaranjado ácido 10 (Dave & Dave 2009, Kolekar *et al.*,

2008), *Proteus* spp. con Rojo RBN (Chen *et al.*, 1999) *Shewanella* spp. con Rojo ácido GR y Negro Remazol B (Xu *et al.*, 2007, Bragger *et al.*, 1997). La aplicación de cultivos bacterianos individuales como *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas luteola*, y *Pseudomonas* sp. han demostrado resultados muy prometedores para la degradación de colorantes azo en condiciones anóxicas (Saratale *et al.*, 2011).

Si bien los colorantes azoicos son generalmente resistentes al ataque de bacterias bajo condiciones aeróbicas por la inhibición de la actividad de la reductasa azo en presencia de oxígeno, algunas cepas de bacterias aeróbicas poseen la capacidad de reducir los grupos azo por la presencia de azorreductasas no sensibles al oxígeno o aeróbicas. Existen reportes de algunas bacterias decoloradoras de tintes azo en condiciones aeróbicas como *Aeromonas hydrophila* (Chen *et al.* 2009) y *Micrococcus* sp, una cepa que decolora tintes más rápido en condiciones aeróbicas que en ambientes anaeróbicos (Olukanni *et al.*, 2009).

a) Degradación biológica de colorantes azo por azorreductasas

Las azorreductasas son un grupo principal de enzimas expresadas en bacterias degradadoras de colorantes azoicos. La degradación bacteriana de los colorantes azo frecuentemente se inicia que catalizan el primer paso en la decoloración: La escisión reductora del enlace azo por las azorreductasas que luego se convierten en aminas correspondientes por degradación aeróbica (Chen, 2006). Se ha demostrado que las azorreductasas reducen compuestos azoicos a través de un mecanismo de Ping Pong Bi Bi (Nakanishi *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2008). El mecanismo propuesto para la reducción del compuesto azo requiere dos ciclos de reducción dependiente de NAD(P)H, que reduce el sustrato azo a una hidrazina en el primer ciclo y reduce la hidrazina a dos aminas en el segundo ciclo (Figura 2) (Blumel *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 2010). Las azorreductasas catalizan la reacción solo en presencia de agentes reductores como NADH, NADPH y FADH₂. Estas moléculas reductoras actúan como un donador de

electrones y participan en la degradación del enlace azo en el sitio intracelular o extracelular de la membrana celular bacteriana. Sin embargo, la mayoría de los colorantes azo se sustituyen por grupos sulfonados y son de alto peso molecular, por lo que no pueden pasar a través de las membranas celulares al entorno intracelular del microorganismo. En estos casos, los compuestos mediadores redox de bajo peso molecular pueden actuar como lanzadores de electrones entre el colorante azo y la azorreductasa dependiente de NADH que se encuentra en la membrana externa de las bacterias (Gingell & Walker, 1971). Por esta razón, las azorreductasas citoplásmicas y unidas a la membrana son conocidas como dos sistemas enzimáticos separados (Kudlich *et al.*, 1997). Muchos investigadores han reportado dentro de los últimos años varias bacterias productoras de azorreductasa (Tabla 1).

Tabla 1. Decoloración de varios colorantes azo por cepas bacterianas productoras de azorreductasas

Cepa Bacteriana	Nombre del colorante	Tiempo (h)	Decoloración (%)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Rojo ácido	48	>70
<i>Alcaligenes sp.</i> AA09	Rojo Reactivo BL	24	100
<i>Bacillus lentus</i> BI377	Rojo Reactivo 141	6	99.11
<i>Bacillus megaterium</i>	Rojo 2G	NA	64.89
<i>Bacillus strain</i> SF	Negro Reactivo 5	6	86
	Mordaz Negro 9	24	38
<i>Bacillus subtilis</i> ORB7106	Rojo de Metilo	48	40-98
<i>Brevibacterium sp.</i> strain VN-15	RY107	96	98
<i>Escherichia coli</i> JM109 (pGEX-AZR)	Azul Directo 71	12	100
<i>Enterococcus gallinarum</i>	Negro Directo 38	20	100
<i>Mutant Bacillus sp.</i> ACT2	Rojo de congo	37-48	12-30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Anaranjado Remazol	24	94
<i>Proteus sp.</i>	Rojo de congo	48	67

Adaptado de Singh *et al.* (2015).

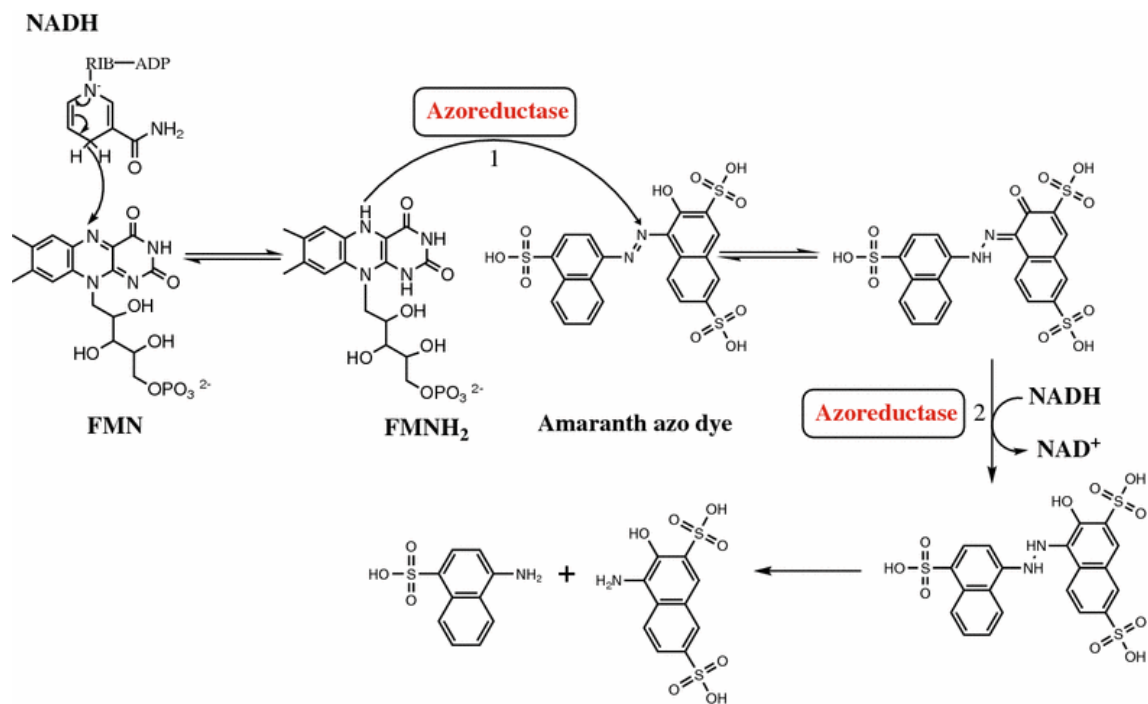


Figura 03. Mecanismo de azorreductasa propuesto para la degradación del colorante azo amaranto. Paso 1. Tras la oxidación de NADH, el hidruro se transfiere a FMN presente en el sitio activo de la azorreductasa. El sustrato (colorante azo amaranto) se une a uno de los sitios activos de la azorreductasa. Luego, el FMN reducido transfiere el hidruro a colorante azo amaranto. El paso 2 es otro ciclo de transferencia de hidruro de NADH al azo amaranto a través de FMN. Extraído de Misal & Gawai (2018).

b) Degradación biológica de colorantes azo por peroxidasas

Las peroxidasas son hemoproteínas que catalizan reacciones en presencia de peróxido de hidrógeno (Duran *et al.*, 2002). Catalizan la oxidación dependiente de H_2O_2 de una variedad de sustratos, más comúnmente pequeños sustratos orgánicos, desempeñando múltiples funciones fisiológicas en una amplia gama de organismos vivos. Se ha demostrado que una nueva familia de peroxidasas microbianas, conocidas como peroxidasas decolorantes de tinte (DyP), degradan con éxito no solo los colorantes basados en antraquinonas de elevado redox, sino también colorantes azoicos. Las DyPs se han clasificado en cuatro subfamilias filogenéticamente distintas, con enzimas bacterianas que constituyen subfamilias A-C y enzimas fúngicas que pertenecen a la subfamilia D (Ogola *et al.*, 2009). Las DyPs muestran residuos conservados característicos en el sitio de unión al hemo, en particular el motivo GXXDG característico y un residuo de aspartato que reemplaza a la histidina distal, que actúa como el catalizador ácido-base en las peroxidasas clásicas. Estructuralmente, estas DyPs comprenden dos dominios que contienen hélices α y láminas β antiparalelas, a diferencia de las peroxidasas de plantas y mamíferos, que son principalmente proteínas α -helicoidales. Ambos dominios adoptan un pliegue único similar a la ferredoxina y forman una grieta en el sitio activo con el co-factor hemo intercalado entre ellos (Sugano 2009; Colpa *et al.*, 2013).

2.4. SECUENCIAMIENTO DE PRÓXIMA GENERACIÓN

La secuenciación de próxima generación (NGS) es una metodología de alto rendimiento que permite la secuenciación rápida de cientos de miles a millones de lecturas de secuencia por corrida. Durante la última década, las tecnologías NGS han incorporado innovaciones revolucionarias para abordar las complejidades de los genomas. Estos avances proporcionan longitudes de lectura tan largas como algunos genomas completos, permitiendo el uso de la secuenciación como herramienta clínica y reduciendo el costo de secuenciar un genoma humano a aproximadamente USD \$ 1,000 (Veritas Genomics, 2015; Goodwin *et al.*, 2016).

El primer sistema NGS disponible fue el instrumento de pirosecuenciamiento Roche 454, seguido por la aparición de sistemas de "segunda generación" que incluyen a Illumina HiSeq/MiSeq/NextSeq, ABI SOLiD, Life Technologies Ion Torrent, y el sistema PacBio RX. Los diferentes proveedores de plataformas de secuenciamiento han diseñado diferentes estrategias para la preparación de bibliotecas de secuencias en plantillas adecuadas, así como para detectar la señal y finalmente leer la secuencia de ADN. Para los sistemas Illumina, Solid, PGM y 454, se requiere una amplificación clonal local de las moléculas de la plantilla inicial para aumentar la relación señal-ruido ya que los sistemas no son lo suficientemente sensibles para detectar la extensión de una base a nivel molecular de la plantilla de ADN individual. Por otro lado, los sistemas Heliscope y PacBio SMRT no necesitan pasos de preamplificación, ya que estos sistemas son lo suficientemente sensibles como para detectar extensiones individuales de plantillas de moléculas individuales. Las diferentes estrategias para generar las lecturas de secuencia también conducen a diferencias en la capacidad de salida para las diferentes plataformas (Buermans *et al.*, 2014).

Tabla 2. Comparación de Tecnologías NGS

Plataforma	Método de Secuenciamiento	Instrumento	Longitud de reads	Exactitud	Reads por corrida	Ventajas	Desventajas
454 Roche	Pirosecuenciamiento	GS FLX+	Hasta 700 pb	99.9%	Hasta 1 millón	Reads largos, tiempos de corrida rápidos	Bajo rendimiento, errores de homopolímeros
SOLiD	Secuenciamiento por ligación	5500 SOLiD	35-50 pb	99.9%	1.0–1.5 billones	Bajo costo por base	Reads muy cortos. lento
Ion Torrent	Ion semiconductor	Ion PGM 318	100-200 pb	98.0%	4–5.5 millones	Tiempos de corrida rápidos	Errores de homopolímeros
		Ion Proton I	200-400 pb	98.0%	60–80 millones	Tiempos de corrida rápidos	Errores de homopolímeros
Illumina	Secuenciamiento por síntesis	HiSeq 2500	50-300 pb	98.0%	0.6–4 billones	Mayor rendimiento, bajo costo por base	Instrumentación costosa
		MiSeq	50-300 pb	98.0%	20–30 millones	Autorizado por la FDA, bajo costo por base	Menos rendimiento
		NextSeq	50-300 pb	98.0%	Hasta 800 billones	Rendimiento intermedio, bajo costo por base	Menos rendimiento
PacBio	Secuenciación a tiempo real de una única molécula de ADN (SMRT)	PacBio RSII	10–15 kb	87% o >99.9%	50,000	Reads largos	Instrumentación costosa
Oxford Nanopore	Secuenciamiento Nanopore	MinION	100 bp–10 kb	60–80% o >99%	10,000–50,000	Secuenciamiento en tiempo real, portable, reads largos	Mayor tasa de error; Bajo rendimiento

Adaptado de Chiu & Miller (2016)

2.4.1. Secuenciamiento por síntesis: Plataforma Illumina

El protocolo de trabajo de la plataforma Illumina comienza con la preparación de una librería por fragmentación aleatoria de la muestra de ADN genómico, seguida de ligación de adaptadores específicos de Illumina en los extremos 5' y 3'. El siguiente paso es la generación de *clusters* o grupos clonales, para esto la librería se carga en una celda de flujo donde se capturan los fragmentos en un césped de oligos unidos a la superficie, complementarios a los adaptadores de la librería. Luego, cada fragmento se amplifica en *clusters* distintos a través de la adición de la enzima DNA polimerasa y nucleótidos no marcados en lo que se conoce como amplificación en puente. Cuando se completa la generación de *cluster*, las plantillas están listas para el secuenciamiento.

La tecnología de secuenciación por síntesis (SBS) utiliza cuatro nucleótidos marcados fluorescentemente para secuenciar las decenas de millones de *clusters* en la superficie de la celda de flujo en paralelo. Durante cada ciclo de secuenciación, se agrega un único desoxinucleósido trifosfato (dNTP) marcado fluorescentemente a la cadena de ácido nucleico. El nucleótido marcado sirve como un terminador para la polimerización, por lo que después de cada incorporación de dNTP, se captura la imagen del colorante fluorescente para identificar la base y luego se escinde enzimáticamente para permitir la incorporación del siguiente nucleótido. Como los cuatro dNTP reversibles vinculados al terminador están presentes durante cada ciclo de secuenciación, la competencia natural minimiza el sesgo de incorporación y reduce enormemente las tasas de error en bruto en comparación con otras tecnologías (Illumina®, Introducción a la tecnología NGS).

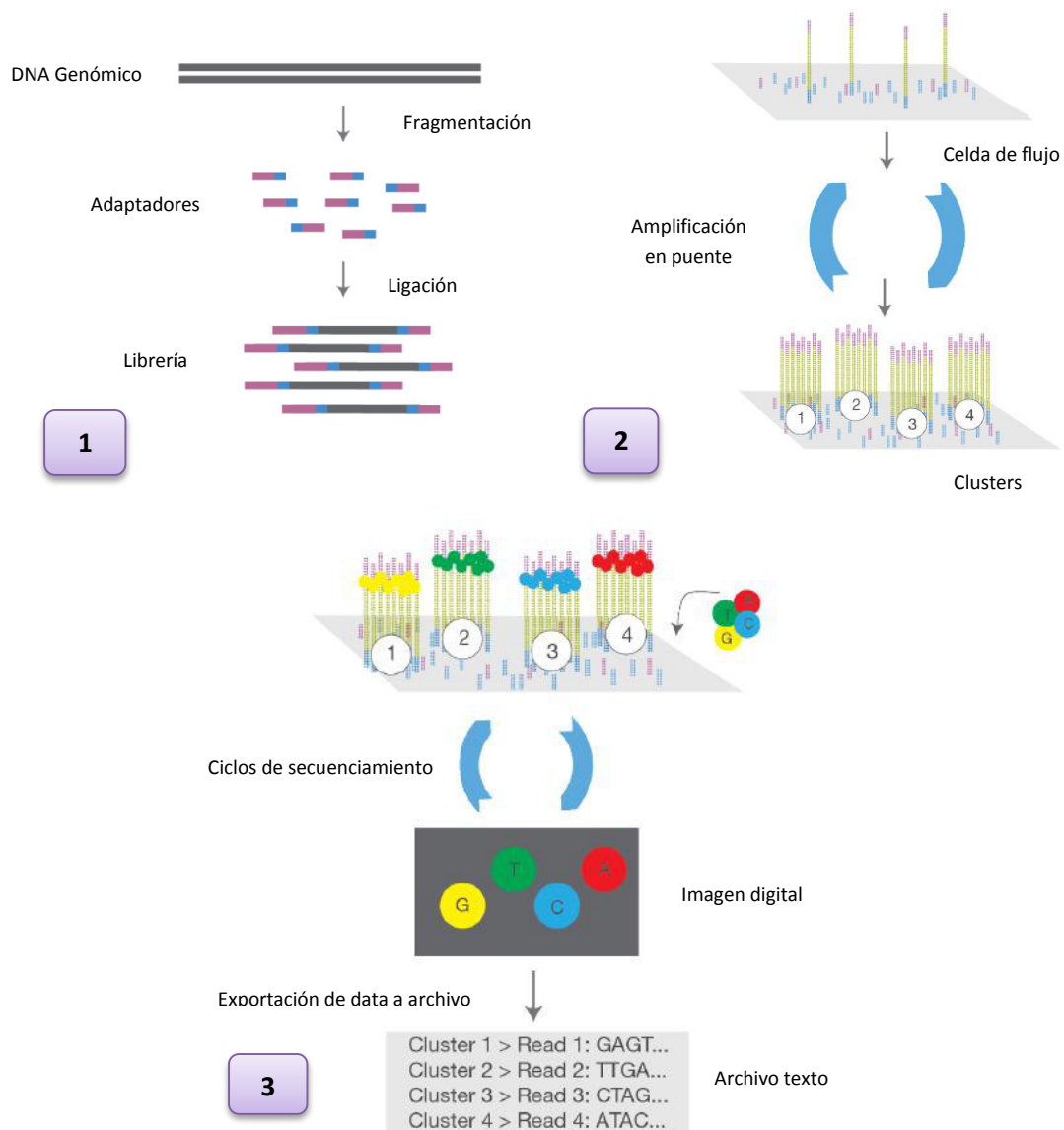


Figura 04. Flujo de trabajo para secuenciamiento por Illumina. 1. Fragmentación de la muestra de ADN genómico y ligación de los adaptadores. 2. Unión de los fragmentos a la celda de flujo y formación de *clusters* por amplificación en puente. 3. Secuenciamiento. Adición de nucleótidos marcados fluorescentemente y captura de imagen digital de cada *cluster*, el ciclo se repite “n” veces para crear un *read* de tamaño de “n” bases. Adaptado de Illumina®.

3. HIPÓTESIS

Las cepas nativas de *Shewanella* sp. poseen caracteres fisiológicos y genómicos que otorgan un potencial en la degradación de colorantes azoicos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL:

- Caracterizar a nivel fisiológico y genómico cepas nativas obtenidas de efluentes de la industria textil con potencial biodegradador de colorantes azo.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Aislar y seleccionar cepas bacterianas con potencial para la decoloración de tintes azoicos a partir de efluentes de la industria textil.
2. Evaluar la capacidad de decoloración de tintes azoicos de las cepas nativas seleccionadas.
3. Secuenciar y ensamblar los genomas completos de las cepas nativas seleccionadas.
4. Identificar filogenómicamente a las cepas seleccionadas.
5. Anotar el genoma e identificar genes asociados a la degradación de colorantes azo en los genomas de *Shewanella* sp.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención de las muestras:

Las muestras fueron colectadas de los efluentes coloreados de una empresa textil ubicada en la Av. Colonial – Cercado de Lima.

5.2. Aislamiento de cepas bacterianas:

De las muestras obtenidas se tomaron alícuotas de 10 mL y se transfirieron a dos matraces de 250 mL conteniendo 90 mL de medio líquido ZZ modificado (Zhou, 1993) que contiene (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5; KH_2PO_4 , 2.66; Na_2HPO_4 , 4.32; Glucosa, 0.5; Extracto de levadura 0.5. Al medio se le agregó el colorante Azul directo 71 a una concentración de 100 ppm, se ajustó a un pH de 7,0 y se incubó en condiciones estáticas a una temperatura de 30°C durante 24 horas. Al término de la incubación se tomó una alícuota de 1 ml de cada matraz y se inocularon en tubos con 9 ml de solución salina realizando diluciones seriales. Se tomaron alícuotas de 0,1 ml de las dos últimas diluciones (10^{-5} , 10^{-6}) y se sembraron por diseminación con ayuda de una espátula de Drigalsky en placas con Agar Nutritivo. Se tomaron asadas de las colonias que presentaron comportamiento cultural diferenciado.

5.3. Reactivación de cepas bacterianas:

Las cepas aisladas se conservaron en un cepario de agar nutritio. Para realizar los distintos ensayos se obtuvieron cultivos jóvenes tomando una asada y sembrando en caldo nutritivo a pH 7. Luego de 24 horas se tomó una asada de cada cultivo reactivado y se sembró mediante estriado a una placa con agar nutritivo para verificar su pureza.

5.4. Selección de la longitud de onda máxima para cada colorante

Los colorantes utilizados en el presente estudio son colorantes obtenidos de la industria textil. Se realizaron mediciones de absorbancias para diferentes longitudes de onda con los colorantes Azul directo 71, Rojo remazol RGB y Amarillo Oro Remazol RGB a fin de seleccionar la longitud de onda máxima para cada uno de ellos en la concentración a utilizar en los ensayos (100 ppm).

5.5. Selección inicial de cepas con potencial biodegradador

Se realizó una evaluación inicial para la selección de cepas con mayor capacidad biodegradadora de los colorantes Azul directo, Rojo remazol y Remazol Navy Blue utilizando la técnica de la placa de microtitulación (Lucas *et al.*, 2008). Un inóculo de 5% (v/v) de cada cultivo reactivado fue agregado al pocillo respectivo en una microplaca de 96 pocillos conteniendo cada uno 200 μ L de medio ZZ con el colorante respectivo a una concentración de 100 ppm. Las microplacas fueron incubadas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. La distribución de cada uno de los pocillos se muestra en la Figura 8. El ensayo se realizó por triplicado. La lectura y selección visual se realizó en relación a la capacidad de decoloración de las cepas para cada uno de los colorantes probados.

5.6. Cinética de decoloración de las cepas LC-2 y LC-6

Se determinó la actividad de decoloración expresada en términos de porcentaje. Un inóculo del 2% de cada cepa seleccionada fue agregado a 100 ml de medio ZZ con el colorante respectivo a una concentración de 100 ppm. Los frascos fueron incubados a 30°C bajo condiciones estáticas. Se tomaron alícuotas de 5 ml cada 4 horas las cuales fueron centrifugadas a 10000 rpm para separar cualquier resto de biomasa. La disminución de la absorbancia en el sobrenadante obtenido fue leída a la longitud de onda máxima para cada colorante. La eficiencia de los aislados para la remoción del colorante se expresó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Decoloración (\%) = \frac{A_o - A_f}{A_o} \times 100$$

Donde:

A_o = Absorbancia inicial

A_f = Absorbancia final del medio decolorizado.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los resultados obtenidos de cada set de datos fueron expresados en términos de media (promedio) y desviación estándar utilizando Microsoft Excel (versión Office 2013). Las cepas con mayor eficiencia de decoloración para los diferentes colorantes ensayados fueron identificadas y seleccionadas para el análisis genómico.

5.7. Características morfológicas de las cepas LC-2 y LC-6

La identificación de las cepas LC-2 y LC-6, las cuales tuvieron una mayor actividad decoloradora, fue llevada a cabo de acuerdo a características morfológicas y genómicas. Se realizó la coloración de Gram para determinar la morfología celular de bacteria. El tamaño, color, forma, textura, elevación y otras características culturales de las cepas seleccionadas fueron identificadas por su crecimiento en agar CASO y se contrastaron con las características del género *Shewanella* según el Manual de Bergey. (Bowman, 2015).

5.8. Preparación de DNA genómico para secuenciamiento

Para la extracción de DNA genómico de las cepas seleccionadas, estas se cultivaron en 3 mL de medio ZZ modificado. Posteriormente fueron centrifugadas a 13000 rpm por 8 minutos y se descartó el sobrenadante. El *pellet* resultante fue utilizado para la extracción de DNA genómico con el Kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y calidad del DNA extraído se cuantificó con ayuda de un espectrofotómetro de microvolúmenes (NanoDrop, Thermo Scientific™), para ello, se alicuotó en microtubos, 5 µL de DNA y 5

μL de buffer TE, el cual fue utilizado como blanco. Finalmente se cuantificó por duplicado una misma muestra, cargando 2 μL sobre el pedestal del lector en cada una de las repeticiones. Las muestras de DNA que cumplieron con los requerimientos especificados (Concentración: >1 μg/μL; pureza: >1,7) fueron seleccionados.

5.9. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para visualizar la integridad del DNA extraído se utilizaron geles de agarosa. Los geles se prepararon en amortiguador TAE 0.5X con 1% de agarosa ultra pura. Las muestras de DNA se mezclaron con solución de carga y como marcadores de tamaño molecular se utilizaron los Ladders ZipRuler de 10 kb y 20 kb DNA (Thermo Scientific™). Luego de la electroforesis los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 μg/mL) durante 20 segundos, para visualizarlos con un fotodocumentador.

5.10. Secuenciamiento total del genoma de las cepas LC-2 y LC-6

Las muestras de DNA de las cepas seleccionadas LC-2 y LC-6 fueron enviadas a MacroGen™ para el secuenciamiento total de sus genomas. El secuenciamiento de siguiente generación se realizó utilizando la tecnología HiSeq 2500 de Illumina®, para la preparación de la librería se utilizó el protocolo de TruSeq con *reads* de 101 pb.

5.11. Ensamblaje de los genomas de las cepas LC-2 y LC-6

La calidad de los *reads* del secuenciamiento, así como la limpieza de secuencias *index* y *adapters* de los *reads* se llevó a cabo con el programa FastQC (Babraham Institute, Bioinformatics). Se realizaron ensamblajes de *novo* con el programa SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012). Se utilizó adicionalmente el software CAP2 (Huang, 1996) para unir *contigs* con regiones idénticas. Así mismo se utilizaron los programas ABACAS (Assefa *et al.*, 2009) e IMAGE (Swain *et al.*, 2012) para extender los *contigs* y reparar *gaps* respectivamente. La calidad de los ensamblajes se verificó con el programa QUAST (Gurevich *et al.*, 2013). Los genomas de cepas del género disponibles en la

base de datos GenBank fueron utilizados para la comparación. El software BRIG fue utilizado para la visualización del mapa circular de los genomas (Alikhan *et al.*, 2011).

5.12. Identificación de las cepas LC-2 y LC-6 mediante análisis filogenético

Para la identificación filogenética de las cepas LC-2 y LC-6 se colectaron genomas de 17 especies del género *Shewanella* representativas y se extrajeron las secuencias concatenadas de los genes *rpoB- gyrB* (Jousset *et al.*, 2018). El análisis y la reconstrucción del árbol se realizó con el software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Los números de accesoión del GenBank se muestran entre paréntesis: *Shewanella halifaxensis* HAW-EB4 (NC_010334.1), *Shewanella baltica* OS223 (CP001252.1), *Shewanella putrefaciens* CN-32 (NC_009438.1), *Shewanella putrefaciens* 200 (NC_017566.1), *Shewanella* sp. W3-18-1 (NC_008750.1), *Shewanella baltica* OS185 (NC_009665.1), *Shewanella denitrificans* OS217 (NC_007954.1), *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400 (NC_008345.1), *Shewanella piezotolerans* WP3 (NC_011566.1), *Shewanella pealeana* ATCC 700345 (NC_009901.1), *Shewanella amazonensis* SB2B (NC_008700.1), *Shewanella loihica* PV-4 (NC_009092.1), *Shewanella oneidensis* MR-1 (NC_004347.2), *Shewanella* sp. ANA-3 (NC_008577.1), *Shewanella* sp. MR-4 (NC_008321.1), *Shewanella* sp. MR-7 (NC_008322.1), *Shewanella* sp. FDAARGOS_354 (CP022089.2)

5.13. Identificación de las cepas LC-2 y LC-6 mediante análisis filogenómico

La identificación filogenómica de las cepas LC-2 y LC-6 se realizó mediante el software Roary (Page *et al.*, 2015) con el cual se reconstruyó un árbol filogenómico basado en el pangenoma de las cepas seleccionadas y de ocho genomas adicionales de *Shewanella* sp. disponibles en el Genbank. Los números de accesoión del GenBank se muestran entre paréntesis: *Shewanella* sp. FDAARGOS_354 (CP022089.2), *Shewanella* sp. Sh95 (NZ_LGYY01000235.1), *Shewanella* sp. MR-4 (NC_008321.1), *Shewanella* sp. MR-7 (NC_008322.1), *Shewanella* sp. ANA-3 (NC_008577.1), *Shewanella* sp. Shew256

(NZ_NAJR01000001.1), *Shewanella* sp. POL2 (NZ_AKZL00000000.1) y *Shewanella* sp. ZOR0012 (NZ_JTLE00000000.1).

5.14. Anotación de los genomas de las cepas *Shewanella* sp. LC-2 y LC-6

La predicción de secuencias codificantes fue realizada con ayuda de la herramienta de anotación para procariotas Prokka (Seemann, 2014). El programa Prodigal fue utilizado para la identificación de secuencias codificantes (Hyatt *et al.*, 2010). Las herramientas TRNAScan-SE tool (Lowe *et al.*, 1997) y RNAmmer (Lagesen *et al.*, 2007) fueron utilizadas para hallar tRNA y rRNA respectivamente. Infernal (Kolbe & Eddy, 2011) se utilizó para el hallazgo de RNA no codificante. El programa EasyFig (Sullivan *et al.*, 2011) fue utilizado para visualizar el alineamiento de los fragmentos genómicos que componen los operones.

6. RESULTADOS

6.1. Obtención de cepas bacterianas a partir de efluentes

Se obtuvieron un total de 12 aislados con características morfológicas diversas, todos crecieron en un periodo de 24-48 horas en medio sólido (Agar CASO). Las colonias fueron inoculadas en caldo CASO y resembradas en medio sólido para verificar su pureza. Las características morfológicas de los aislados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 3. Características culturales de los aislados en medio CASO

Aislado	Forma	Color	Elevación	Bordes	Superficie
LC-1	Irregular	Anaranjado	Plana	Irregular	Lisa
LC-2	Irregular	Anaranjado	Elevada	Irregular	Lisa
LC-3	Irregular	Crema	Convexa	Irregular	Rugosa
LC-4	Irregular	Blanca	Elevada	Entero	Lisa
LC-5	Irregular	Crema	Elevada	Entero	Concéntrica
LC-6	Irregular	Anaranjado	Plana	Irregular	Lisa
LC-7	Irregular	Blanca	Convexa	Irregular	Lisa
LC-8	Irregular	Amarilla	Plana	Irregular	Rugosa
LC-9	Irregular	Crema	Convexa	Entero	Rugosa
LC-10	Irregular	Blanca	Elevada	Irregular	Rugosa
LC-11	Irregular	Crema	Convexa	Irregular	Lisa
LC-12	Irregular	Crema	Plana	Irregular	Lisa

6.2. Selección de longitud de onda máxima para cada colorante

Las longitudes de onda máximas para los colorantes Azul directo 71, Rojo remazol RGB y Amarillo Oro Remazol RGB a la concentración de 100 ppm fueron de 583, 519 y 410 nm, respectivamente.

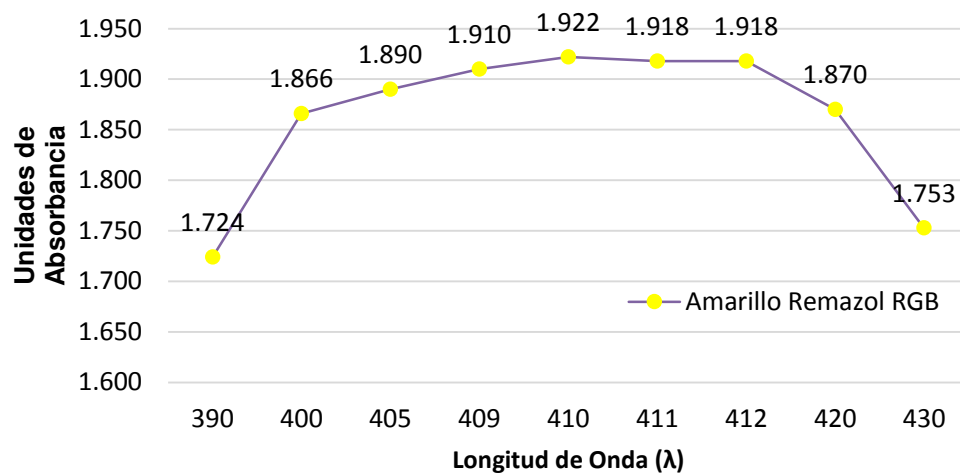


Figura 05. Obtención del $\lambda_{\text{máx}}$ de Amarillo Remazol RGB a 100 ppm

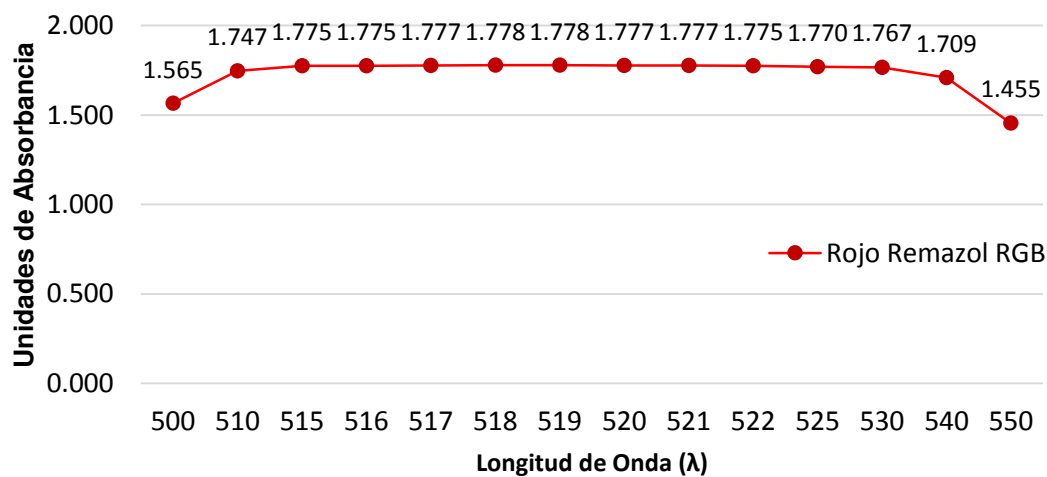


Figura 06. Obtención del $\lambda_{\text{máx}}$ de Rojo Remazol RGB a 100 ppm

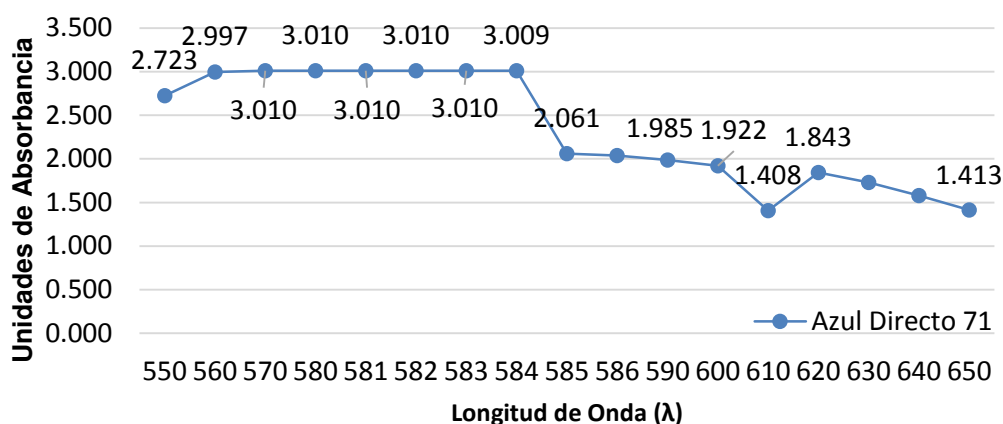


Figura 07. Obtención del $\lambda_{\text{máx}}$ de Azul directo 71 a 100 ppm

6.3. Selección de cepas con potencial biodegradador

Los doce aislamientos bacterianos fueron evaluados frente a los tres colorantes azoicos usando la técnica de placas de microtitulación. Las cepas que demostraron una respuesta positiva a las 24 horas a la decoloración de Azul directo 71, Rojo remazol RGB y Amarillo Oro Remazol RGB se muestran en la Tabla 2. Tal como se evidencia en la Fig. 2, los colorantes Rojo Remazol RGB y Amarillo Oro Remazol RGB fueron decolorados por las cepas LC-1, LC-2, LC-5, LC-6, LC-7, LC-10 y LC-11 mientras que el Azul directo 71 fue decolorado solo por las cepas LC-1, LC-2, LC-5, LC-6 y LC-7. Así mismo, el ensayo de microplacas permitió diferenciar las cepas con mayor capacidad de decoloración (Tabla 2). Los pocillos en los cuales se evidenció una mayor decoloración de los tres colorantes azoicos a las 24 horas fueron los correspondientes a las cepas LC-2 y LC-6. Ambas cepas fueron seleccionadas para los ensayos de cinética de decoloración. La Figura 8 ilustra la distribución de las cepas en la microplaca y la decoloración a las 24 horas.

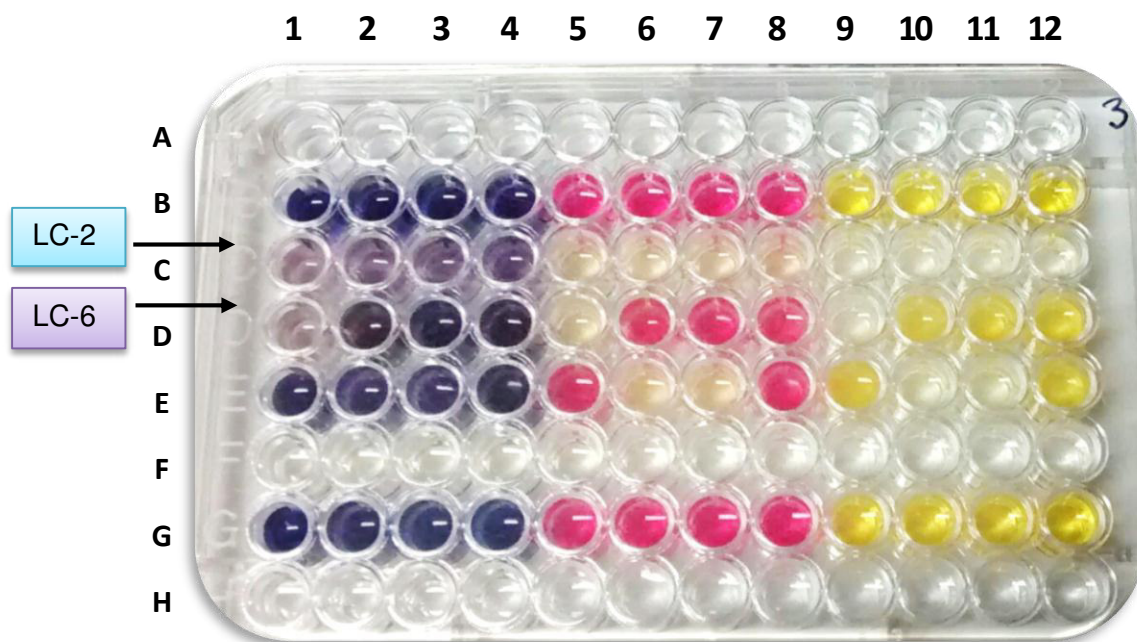


Figura 08. Decoloración en microplaca por cepas bacterianas en medio ZZ suplementado con Azul directo 71, Rojo remazol RGB y Amarillo Oro Remazol RGB después de 24 horas de incubación.

Fila A, F y H: Pocillos con agua destilada. Filas B y G: Pocillos control.

Fila C: De izquierda a derecha pocillos inoculados: LC-2, LC-1, LC-5, LC-7.

Fila D: De izquierda a derecha pocillos inoculados: LC-6, LC-3, LC-4, LC-8.

Fila E: De izquierda a derecha pocillos inoculados: LC-9, LC-10, LC-11, LC-12.

Tabla 4. Decoloración de Azul Directo 71, Rojo Remazol RGB y Amarillo Remazol RGB por el método de microplacas.

CEPA	NOMBRE DEL COLORANTE AZO		
	Azul Directo 71	Rojo remazol RGB	Amarillo Oro Remazol RGB
LC-1	+	++	++
LC-2	++	++	++
LC-3	-	-	-
LC-4	-	-	-
LC-5	+	++	++
LC-6	++	++	++
LC-7	+	++	++
LC-8	-	-	-
LC-9	-	-	-
LC-10	-	++	++
LC-11	-	++	++
LC-12	-	-	-

- * (-) No se evidenció decoloración
 (+) Decoloración visible
 (++) Decoloración altamente visible

6.4. Cinéticas de decoloración por cepas LC-2 y LC-6

Shewanella sp. LC-2 demostró una actividad decolorante de 94.42, 94.79 y 91.67% frente a Azul Directo 71, Rojo Remazol RGB y Amarillo Remazol RGB respectivamente, mientras que *Shewanella* sp. LC-6 obtuvo 94.37, 94.92 y 83.24% para los mismos colorantes. Se obtuvieron porcentajes de decoloración superiores a 90% en todos los casos con excepción de la decoloración de Amarillo Oro Remazol RGB por la cepa LC-6, la cual alcanzó un máximo de 83.24% a las 24 horas. Se observó una eficiencia similar de ambos aislados para la decoloración de los 3 colorantes azoicos a las 24 horas; sin embargo la cepa LC-6 demostró una mayor actividad decolorante a las 8 horas obteniendo porcentajes de 57.99, 90.99 y 76.30 frente a Azul Directo 71, Rojo Remazol RGB y Amarillo Remazol RGB respectivamente, mientras que la cepa LC-2 obtuvo una eficiencia de 7.86, 39.03, 16.56 para los mismos colorantes (Tabla 5). Ambas cepas fueron seleccionadas para el secuenciamiento de su genoma al no obtener una diferencia significativa en sus porcentajes de decoloración a las 24 horas.

Tabla 5. Decoloración de tintes textiles en condiciones estáticas a 30°C.

Cepa	Colorante	Absorbancia* inicial	Absorbancia* 8h	Absorbancia* 24h	Porcentaje de Decoloración (%) (8h)	Porcentaje de Decoloración (%) (24h)
LC-2	Azul Directo 71	2.030	1.870	0.113	7.86	94.42
	Rojo remazol RGB	1.413	0.861	0.074	39.03	94.79
	Amarillo Oro Remazol RGB	0.955	0.090	0.075	16.56	91.68
LC-6	Azul Directo 71	1.971	0.828	0.081	57.99	94.37
	Rojo remazol RGB	1.456	0.131	0.074	90.99	94.92
	Amarillo Oro Remazol RGB	1.189	0.203	0.180	76.30	83.24

*Absorbancia medida a 583 para Azul Directo 71, 519 nm para Rojo Remazol RGB y 410 nm para Amarillo Remazol RGB

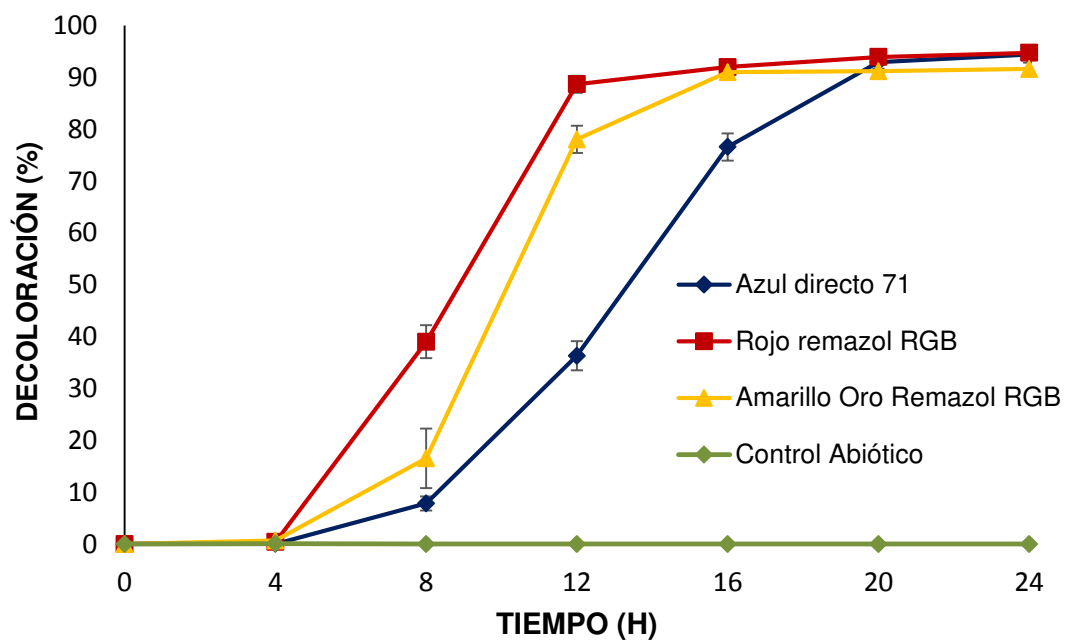


Figura 09. Cinética de decoloración de la cepa LC-2 en el medio ZZ suplementado con Azul Directo 71, Rojo Remazol RGB y Amarillo Remazol RGB a 100 ppm de concentración.



Figura 10. Proceso de decoloración de Amarillo Remazol RGB por la cepa LC-2 en Medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.

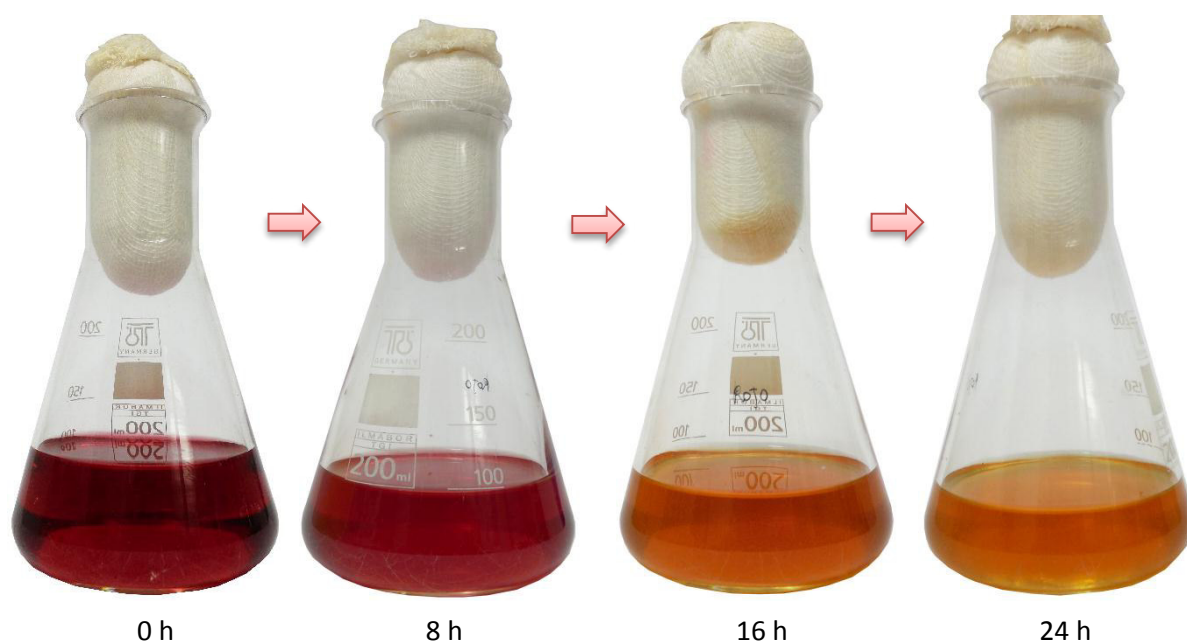


Figura 11. Proceso de decoloración de Rojo Remazol RGB por la cepa LC-2 en Medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.

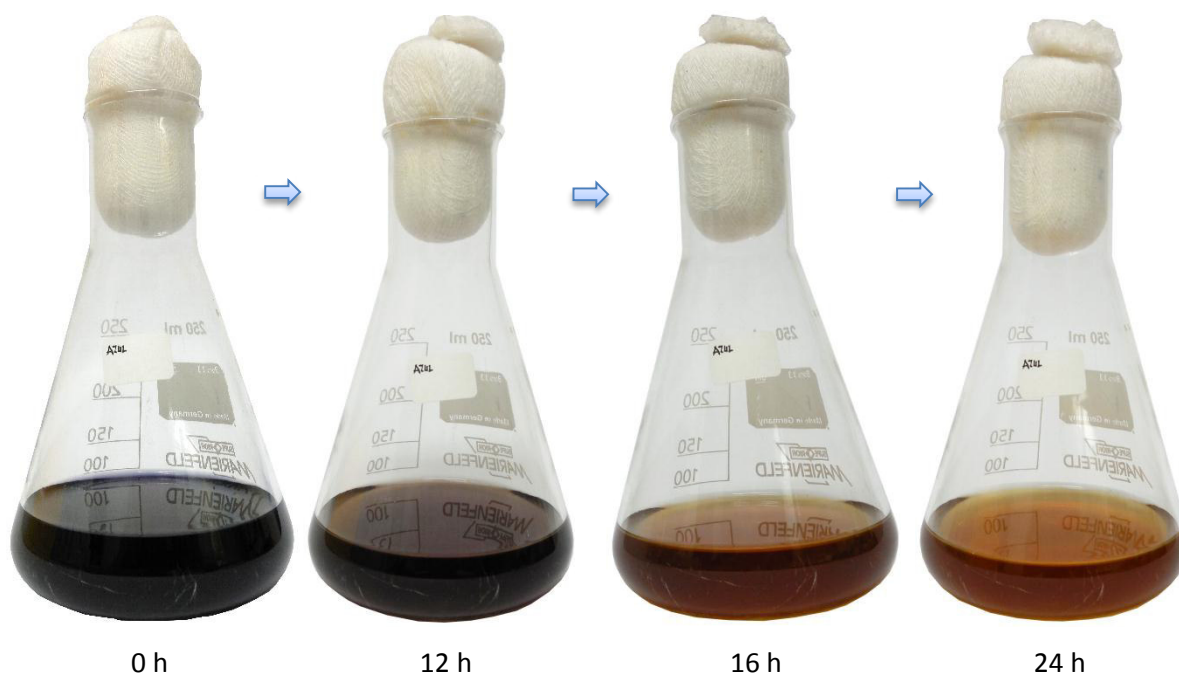


Figura 12. Proceso de decoloración de Azul Directo 71 por la cepa LC-2 en Medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.

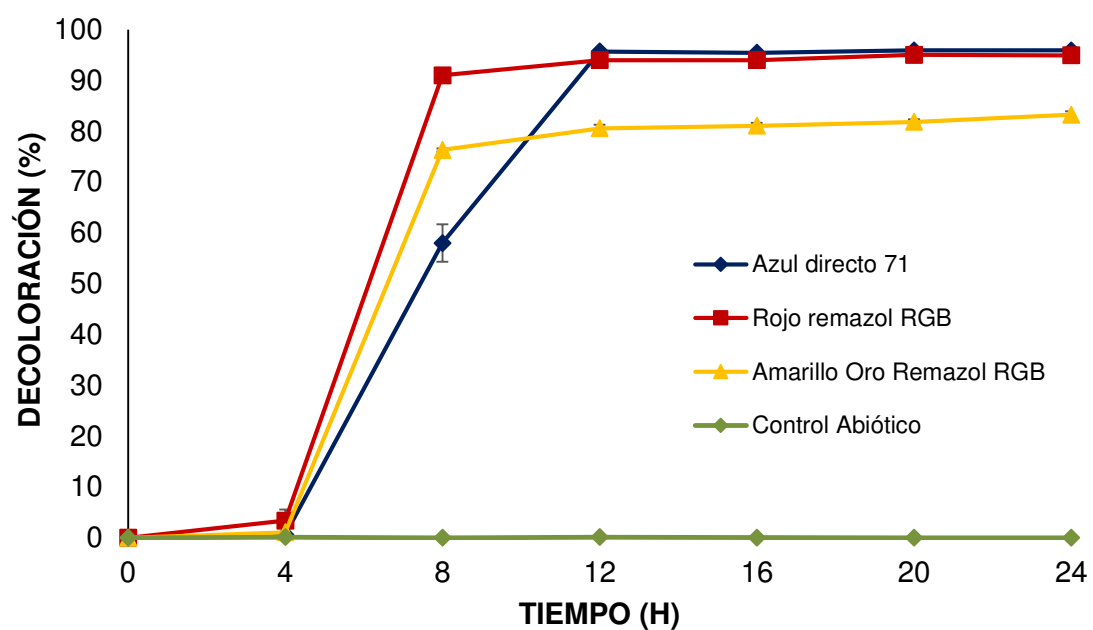
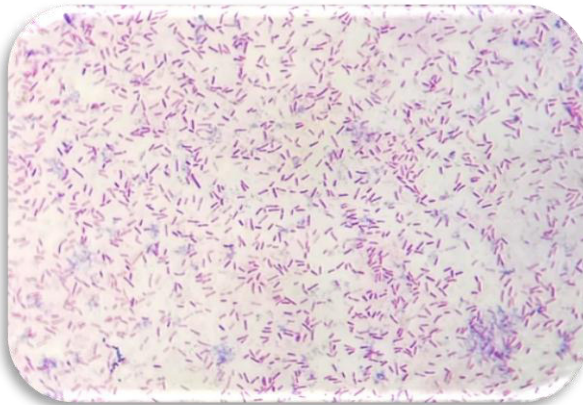


Figura 13. Cinética de decoloración de la cepa LC-6 en el medio ZZ suplementado con Azul Directo 71, Rojo Remazol RGB y Amarillo Remazol RGB a 100 ppm de concentración.

6.5. Características morfológicas de las cepas seleccionadas

Se obtuvieron cultivos jóvenes de ambas cepas seleccionadas, los cuales crecieron a 30°C en Caldo Caso a las 24h. La coloración Gram evidenció la presencia de bacilos Gram negativos (Fig. 14). Así mismo, se observó el crecimiento de colonias en agar CASO a las 24h. La cepa LC-2 presentó colonias medianas de forma circular y de borde irregular, mientras que las colonias de la cepa LC-6 presentaron gran tamaño, de forma y borde irregular. Ambas cepas presentaron la pigmentación anaranjada típica presente en las colonias del género *Shewanella* de acuerdo a lo señalado en el Manual de Bergey (Fig. 15).

A.



B.

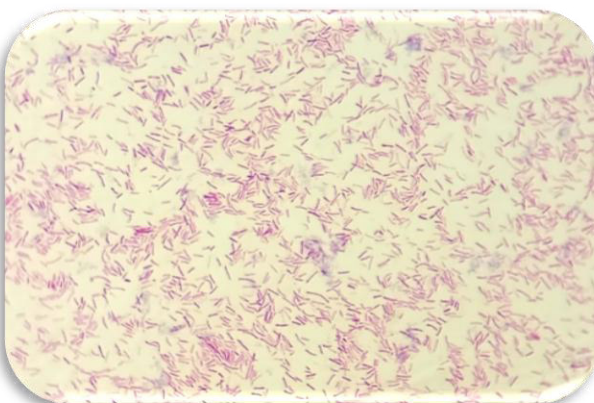
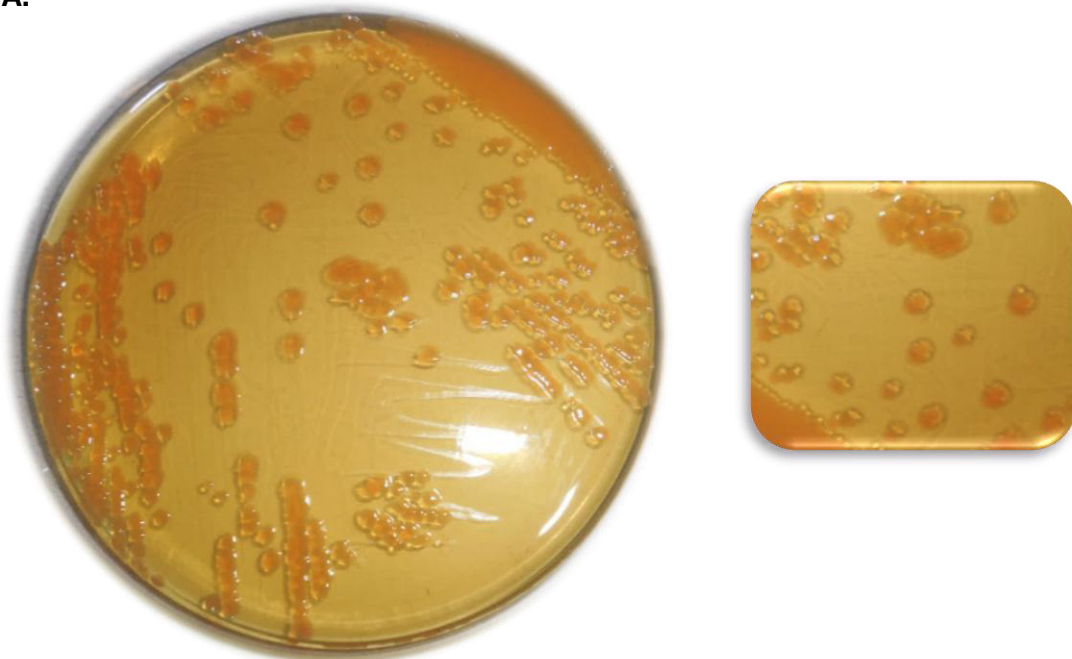


Figura 14. Coloración Gram de las cepas seleccionadas. (A) Ceba LC-2 y (B) Ceba LC-6

A.



B.



Figura 15. Colonias en placa de las cepas seleccionadas en Agar CASO a las 24 horas.

(A) Cepa LC-2 y (B) Cepa LC-6.

6.6. Extracción de DNA genómico de las cepas LC-2 y LC-6

La extracción de DNA reveló la presencia de plásmidos de aproximadamente 20 kb en ambas cepas (Fig. 16).

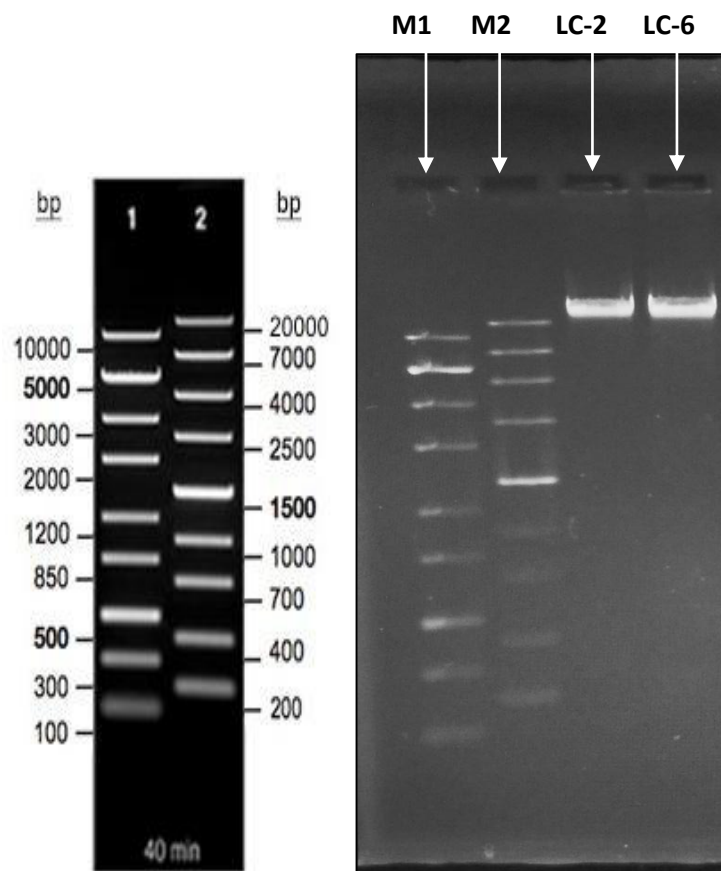


Figura 16. Integridad del DNA de las cepas LC-2 y LC-6 analizadas en un gel de agarosa al 1%. Se observa la presencia de plásmidos de aproximadamente 20 kbp. M1: Ladder 1 hasta 10 kb, M2: Ladder 2 hasta 20 kb (Thermo Scientific ZipRuler).

6.7. Análisis filogenético de las cepas seleccionadas

Se realizó un árbol filogenético comparando las secuencias concatenadas de los genes *rpoB*-*gyrB* de las cepas LC-2 y LC-6, con otras cepas representativas de *Shewanella* spp (Figura 17). El análisis reveló que no pertenecían a ninguna especie conocida de *Shewanella*.

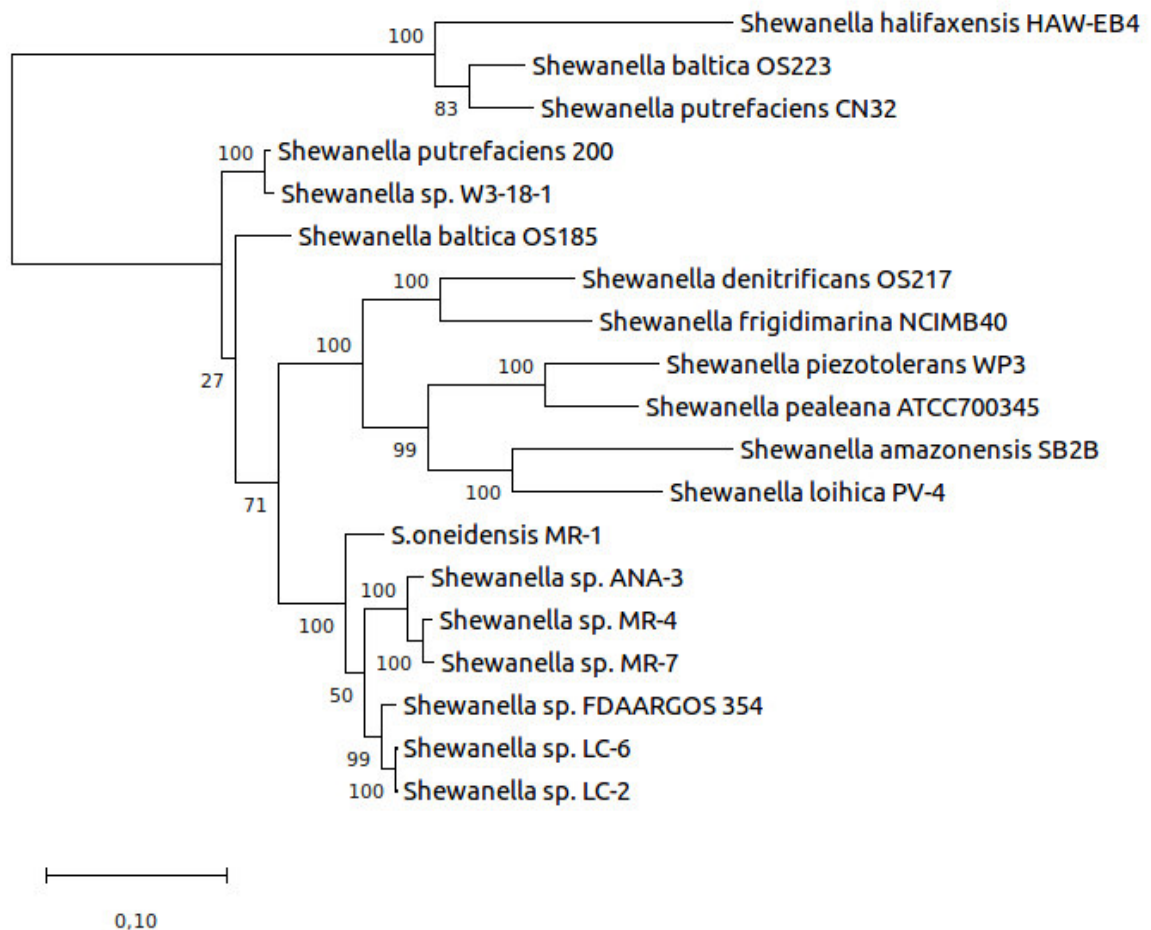


Figura 17. Árbol filogenético de *Shewanella* spp. basado en los genes *gyrB* y *rpoB*. El árbol fue construido por el método de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei con valores de confiabilidad (*bootstrap values*) de 1000 réplicas, usando el software MEGA (MEGA X). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama que representan distancias evolutivas.

6.8. Análisis filogenómico de las cepas seleccionadas

Para intentar caracterizar las relaciones genéticas entre *Shewanella* spp., se realizó un árbol filogenómico basado en la información del genoma completo (pangenoma) de las diez cepas, incluyendo a *Shewanella* sp. LC-2 y *Shewanella* sp. LC-6. El árbol filogenómico reveló la estrecha relación genética de ambas cepas con otras *Shewanella* sp, siendo muy cercana al grupo filogenómico de *Shewanella* sp. FDAARGOS_354 (Figura 18).

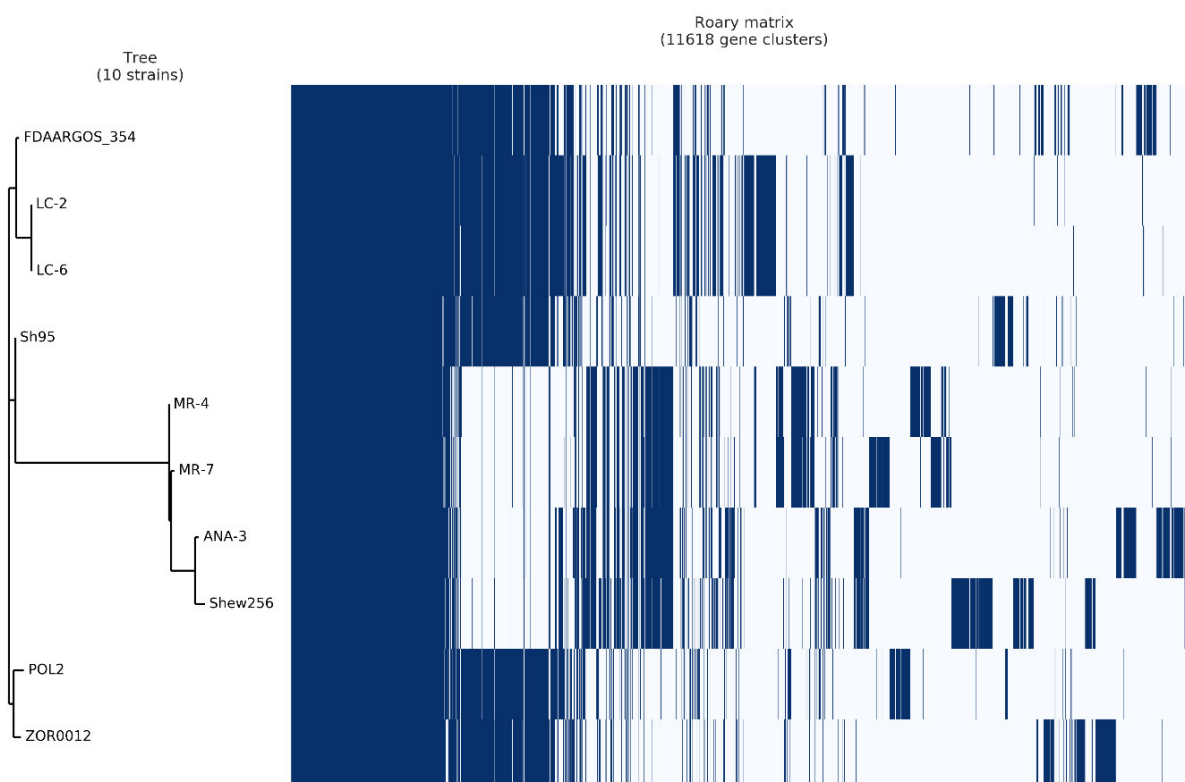


Figura 18. Árbol filogenómico basado en el contenido diferencial de 10 genomas de *Shewanella* incluyendo las cepas LC-2 y LC-6. Los números de accesoión del GenBank se muestran entre paréntesis: *Shewanella* sp. FDAARGOS_354 (CP022089.2), *Shewanella* sp. Sh95 (NZ_LGYY01000235.1), *Shewanella* sp. MR-4 (NC_008321.1), *Shewanella* sp. MR-7 (NC_008322.1), *Shewanella* sp. ANA-3 (NC_008577.1), *Shewanella* sp. Shew256 (NZ_NAJR01000001.1), (*Shewanella* sp. POL2 (NZ_AKZL00000000.1) y *Shewanella* sp. ZOR0012 (NZ_JTLE00000000.1).

6.9. Análisis del genoma de *Shewanella* sp. LC-2 y LC-6

La cepa nativa de *Shewanella* sp. LC-2 presentó un genoma de 5355693 pb distribuidos en 147 contigs con un N50 de 67043 pb. En tanto que, la cepa nativa de *Shewanella* sp. LC-6 presentó un genoma de 5343011 pb distribuidos en 134 *contigs* con un N50 de 69978 pb (Tabla 4). Además, los genomas de las cepas *Shewanella* sp. LC-2 y LC-6 presentaron un 46.22 y 46.21% de GC, respectivamente. Dichos porcentajes fueron similares a los de *Shewanella* sp. FDAARGOS_354 (46.38% GC) y ANA-3 (47.97% GC) en el rango de los ~38-54% reportado en el género *Shewanella*.

Tabla 6. Parámetros y estadísticos del ensamblaje de los genomas de *Shewanella* sp. LC-6 y LC-2.

Parámetros y Estadísticos	<i>Shewanella</i> sp. LC-2	<i>Shewanella</i> sp. LC-6
# Contigs	147	134
# Contigs (≥ 0 pb)	147	134
# Contigs (≥ 1000 pb)	144	133
Contig más Largo	205449	205605
Longitud Total	5355693	5343011
Longitud Total (≥ 1000 pb*)	5351798	5342318
N50	67043	69978
N75	35715	39587
GC(%)	46.22	46.21
No determinados		
# N's	0	0
# N's Per 100 Kpb	0	0

*contigs con tamaño mayor a 1000 pb.

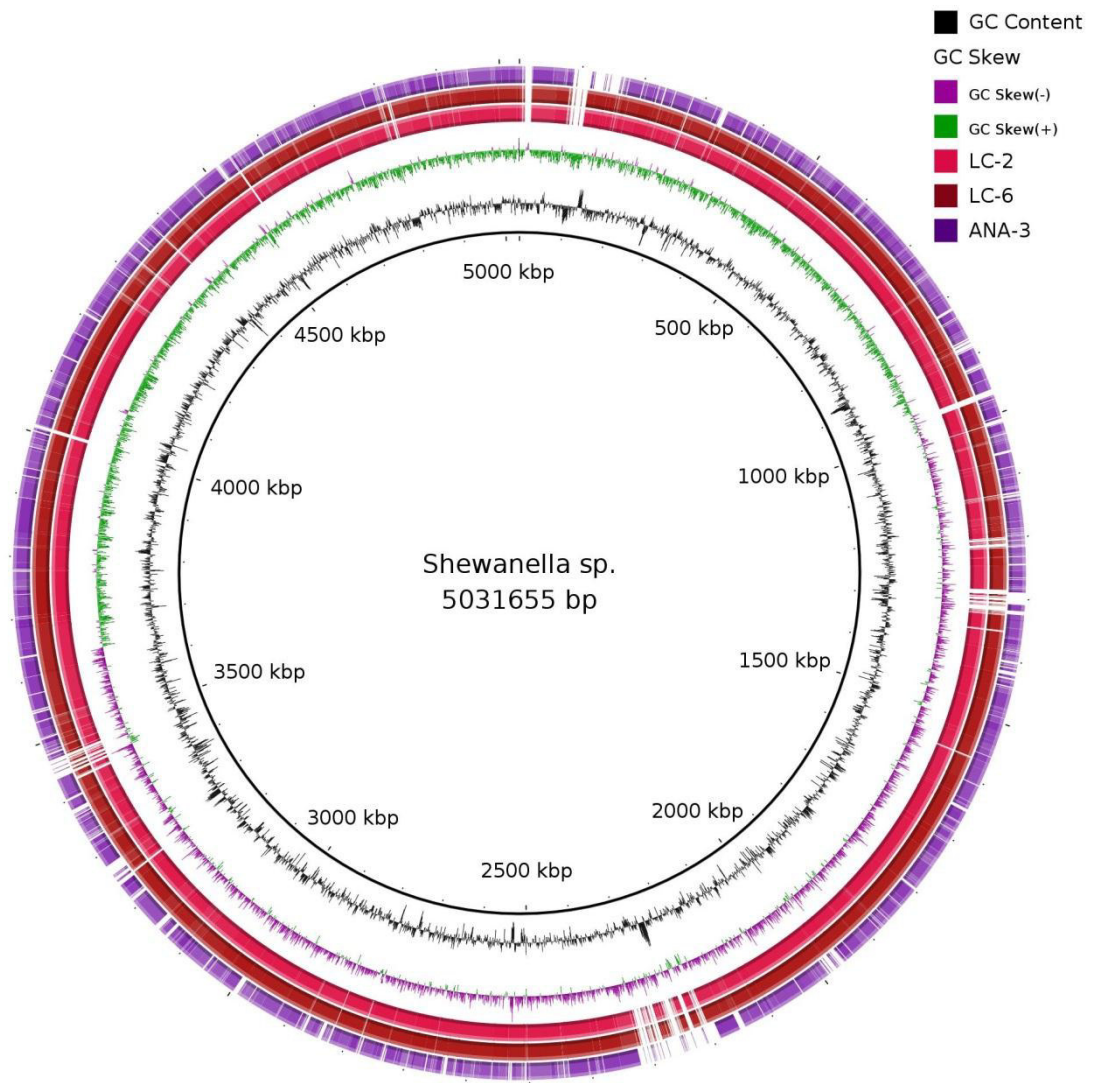


Figura 19. Alineamiento circular de genomas de *Shewanella* sp. FDAARGOS_354, *Shewanella* sp. LC-2 y *Shewanella* sp. LC-6 utilizando el genoma de *Shewanella* sp. FDAARGOS_354 como referencia base (primer anillo). El porcentaje de GC (segundo anillo) se muestra de color negro. La desviación GC (tercer anillo) se muestra de color morado y verde. Los genomas de *Shewanella* sp. LC-2 (cuarto anillo), *Shewanella* sp. LC-6 (quinto anillo) y *Shewanella* sp. ANA-3 están de color rosado, rojo y morado respectivamente.

La anotación realizada con el predictor PROKKA identificó 4955 genes en la cepa *Shewanella* sp. LC-2, de los cuales, 4874 tuvieron función asignada, 9 fueron de RNA ribosómico, 71 de RNA de transferencia y un RNA no codificante. Por otro lado, en la cepa *Shewanella* sp. LC-6 se identificaron 4948 genes, de los cuales, 4859 tuvieron función asignada, 10 fueron de RNA ribosómico, 78 de RNA de transferencia y un RNA no codificante (Tabla 5).

Tabla 7. Comparación de las características del genoma de *Shewanella* sp. LC-2, *Shewanella* sp. LC-6 con los de: *Shewanella* sp. FDAARGOS_354 y ANA-3.

Especie	<i>Shewanella</i> sp.			
	<u>LC-2</u>	<u>LC-6</u>	<u>FDAARGOS 354</u>	<u>ANA-3</u>
Cepa				
Contigs	147	134	1	1
Total de Bases	5 355 693	5 343 011	5 031 863	4 972 204
CDS	4874	4859	4569	4421
tRNA	71	78	103	104
rRNA	9	10	28	28
Otros RNAs	1	1	4	4

Una de las especies más estudiada del género *Shewanella* y de importancia biotecnológica es la cepa *Shewanella oneidensis* MR-1, en ésta se ha identificado a una azorreductasa dependiente de NADPH la cual forma parte de un operón, el cual incluye a su vez un regulador transcripcional, una proteína de la familia glioxalasa y una proteína hipotética. Para comprobar la presencia de dicho operón se compararon a nivel nucleotídico los genomas de la cepa *Shewanella oneidensis* MR-1 con las del presente estudio. Se comprobó su presencia en ambas cepas con identidades de 89% para la azorreductasa dependiente de NADPH, 91% para el regulador transcripcional, 97% para

la proteína de la familia VOC (anteriormente anotada como glioxalasa) y 98% para la proteína de la familia YcxB (anotada anteriormente como proteína hipotética). Así mismo el alineamiento mostró una reorganización en la posición y sentido de expresión de genes en las cepas *Shewanella* sp. LC-2 y *Shewanella* sp. LC-6 (Figura 20).

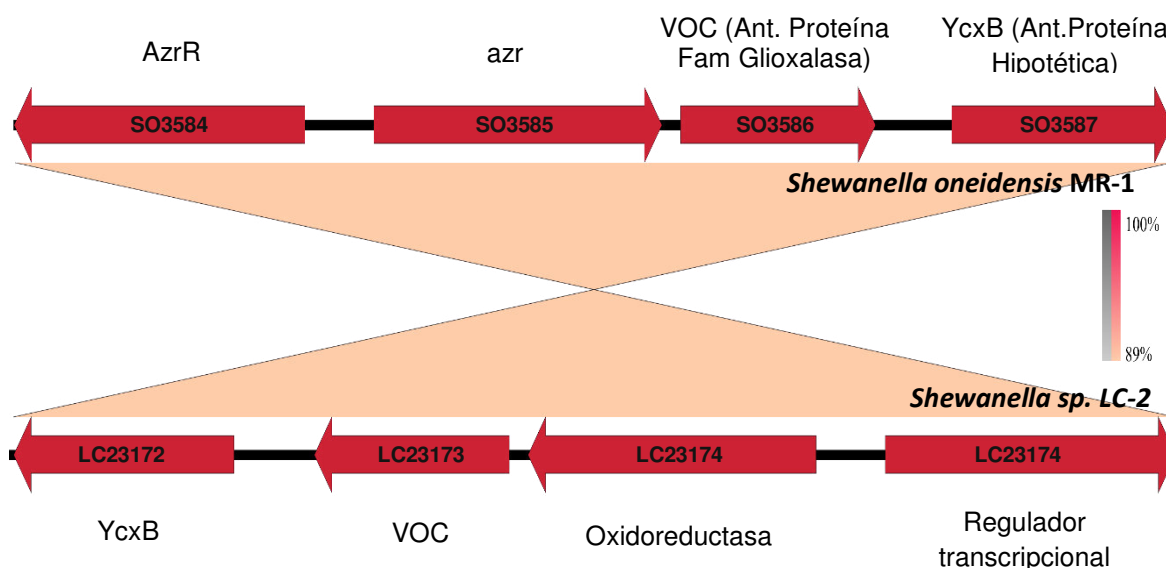


Figura 20. Alineamiento del operón de la azorreductasa putativa de *Shewanella oneidensis* MR-1 y *Shewanella* sp. LC-2.

FMN azorreductasa dependiente de NADH

La anotación de los genomas de *Shewanella* sp. LC-2 y *Shewanella* sp. LC-6 reveló la presencia de un ORF de 597 pb que codifica una proteína de 198 aa identificada como FMN azorreductasa dependiente de NADH. Las búsquedas de similaridad empleando BlastX contra la base de datos del GenBank revelaron un 64% de identidad de secuencia con AzoR, la FMN azorreductasa dependiente de NADH de *Escherichia coli*; además, las mejores coincidencias de Blast fueron con azorreductasas de otras especies secuenciadas de *Shewanella* spp (Figura 21).

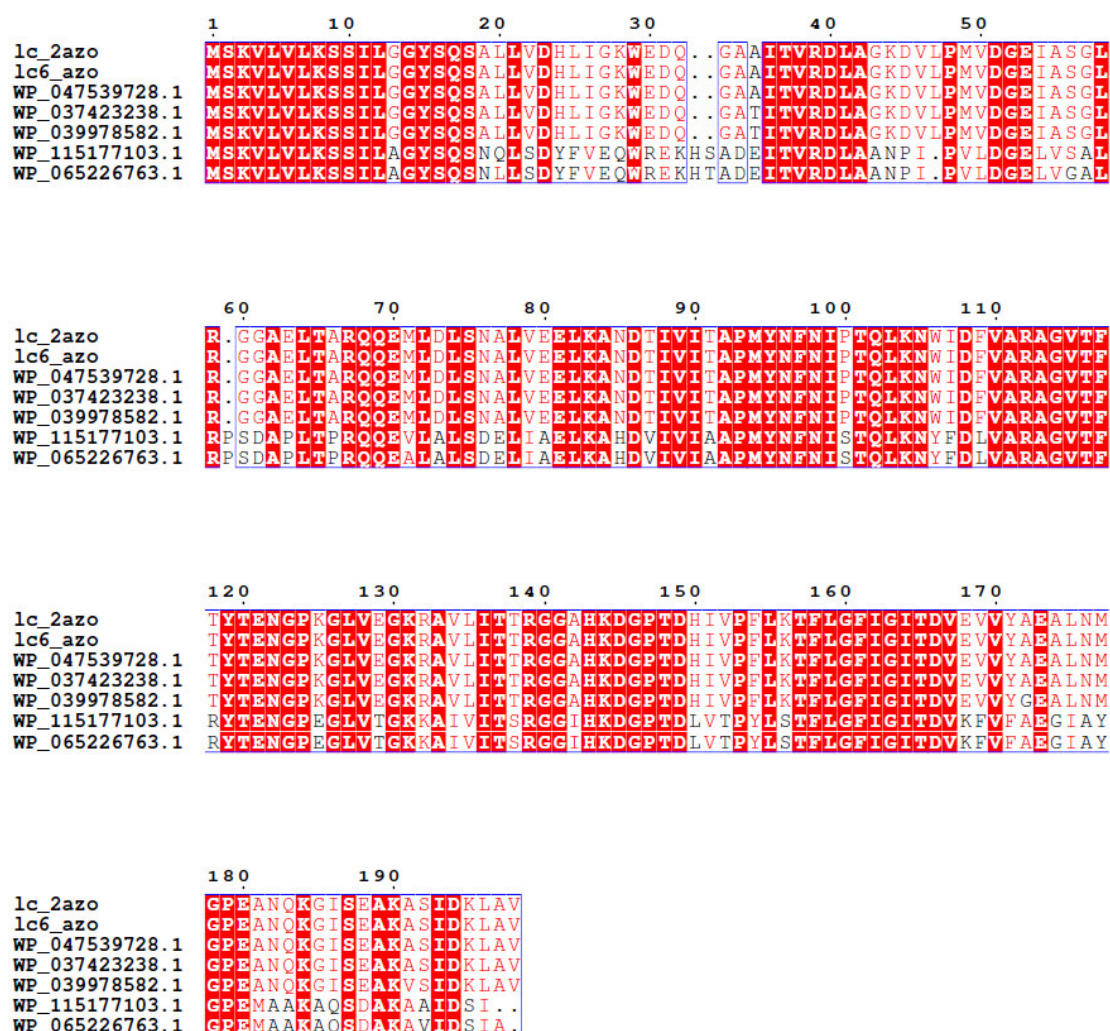


Figura 21. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de FMN azoreductasa dependiente de NADH. El alineamiento fue realizado con MUSCLE. Los números de acceso corresponden a FMN azoreductasas dependientes de NADH WP_047539728.1 (*Shewanella* sp.), WP_037423238.1 (*Shewanella* sp.), WP_039978582.1 (*Shewanella decolorationis*), WP_115177103.1 (*Escherichia coli*), WP_065226763.1 (*Escherichia coli*), NP_249476.1 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1).

Peroxidasa decolorante de tintes (DyP)

La anotación de ambas cepas reveló además la presencia de un ORF de 942 pb que codifica una proteína de 313 aa identificada como peroxidasa decolorante de tintes (DyP). Las búsquedas de similaridad empleando BlastX contra la base de datos del GenBank revelaron un 100% de identidad de secuencia con una peroxidasa decolorante de tintes (DyP) de *Shewanella xiamenensis*; además, los mejores éxitos con el Blast fueron con otras peroxidasas decolorante de tintes de otras especies secuenciadas de *Shewanella* spp. (Figura 22).

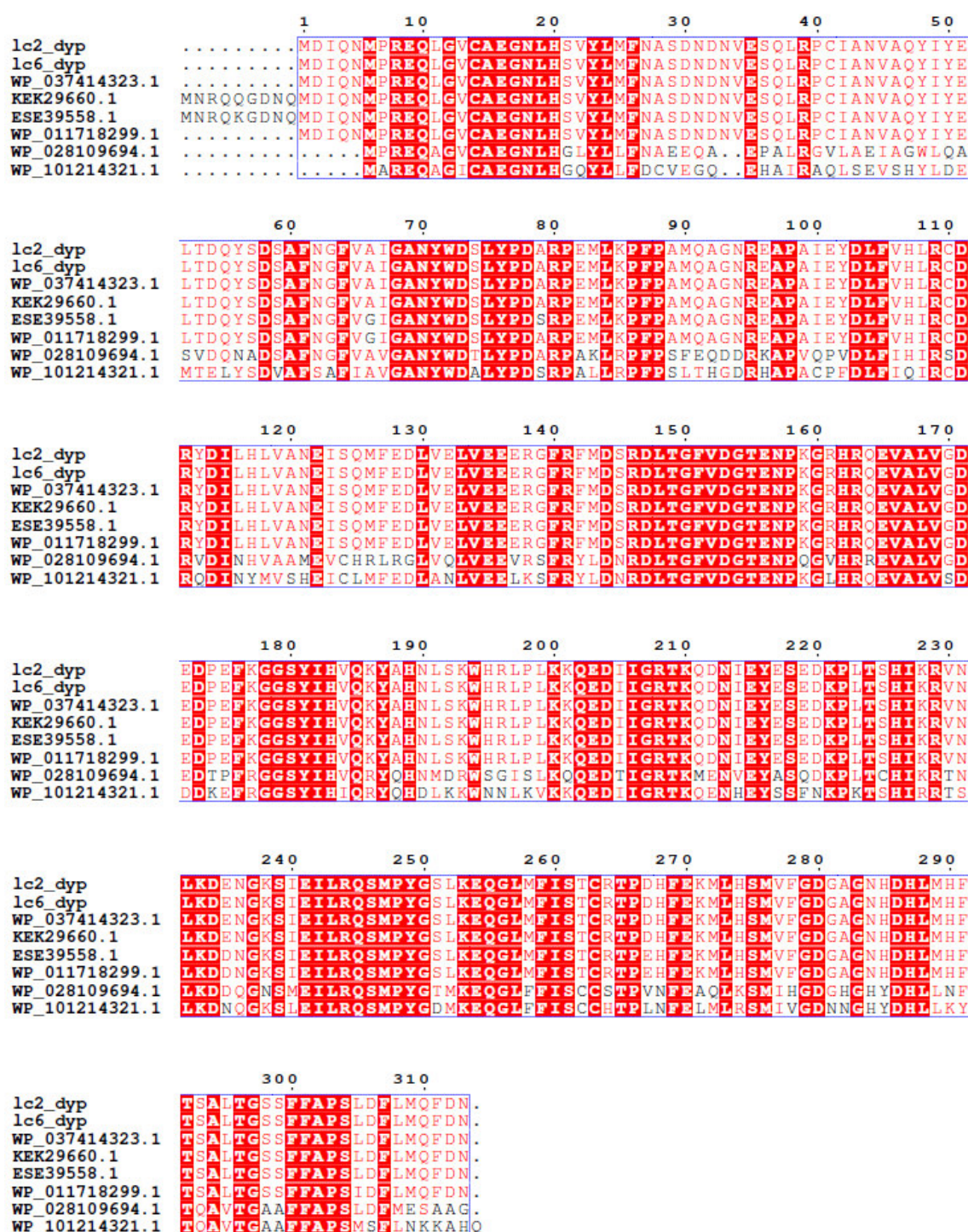


Figura 22. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de peroxidasa decolorante de tintes (DyPs). El alineamiento fue realizado con MUSCLE. Los números de acceso corresponden a KEK29660.1 (*Shewanella xiamenensis*), WP_037414323.1 (*Shewanella* sp.), WP_011718299.1 (*Shewanella* sp. ANA-3), ESE39558.1 (*Shewanella decolorationis* S12), WP_028109694.1 (*Ferrimonas fultsuensis*), WP_101214321.1 (*Alteromonadales bacterium alter-6D02*)

Tabla 8. Anotación de genes relacionados al metabolismo de colorantes azo en el genoma de *Shewanella* sp. LC-2

N°	Posición (Cadena)	Codón de inicio/terminación	Tamaño (aa)	Gen	Producto	Homólogo(s) (Accesión GenBank)	% Identidad
1	91022...91618 (+)	ATG/TAA	198	azoR	Azorreductasa dependiente de NADH	MULTISPECIES: FMN-dependent NADH-azoreductase [<i>Shewanella</i>](WP_037423238.1)	197/198(99%)
2	156530...156060 (-)	ATG/TGA	156	-	YcxB family protein	YcxB family protein [<i>Shewanella xiamenensis</i>] (WP_099457613.1)	156/156(100%)
3	157117...156701 (-)	ATG/TAA	138	-	VOC family protein	VOC family protein [<i>Shewanella oneidensis</i>] (WP_011073406.1)	134/138(97%)
4	157771...157157 (-)	ATG/TAA	204	-	Oxidoreductasa dependiente de NADPH	NADPH-dependent oxidoreductase [<i>Shewanella xiamenensis</i>] (WP_099457615.1) NADPH-dependent azoreductase Azr [<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1]	199/204(98%) 182/204(89%)
5	157918...158538 (+)	ATG/TAG	206	-	Regulador Transcripcional	Transcriptional regulator [<i>Shewanella xiamenensis</i>] (WP_069454396.1) Superoxide-responsive transcriptional repressor of superoxide stress response AzrR [<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1] (NP_719127.1)	205/206(99%) 187/206(91%)
6	15917...14976 (-)	ATG/TAA	313	-	Peroxidasa decolorante de Tintes (DyP)	Dyp-type peroxidase family protein [<i>Shewanella xiamenensis</i>] (KEK29660.1)	313/313(100%)

Tabla 9. Anotación de genes relacionados al metabolismo de colorantes azo en el genoma de *Shewanella* sp. LC-6

N°	Posición (Cadena)	Codón de inicio/terminación	Tamaño (aa)	Gen	Producto	Homólogo(s) (Accesión GenBank)	% Identidad
1	91068...91664 (+)	ATG/TAA	198	azoR	Azorreductasa dependiente de NADH	MULTISPECIES: FMN-dependent NADH-azoreductase [<i>Shewanella</i>](WP_037423238.1)	197/198(99%)
2	155990...155520 (-)	ATG/TGA	156	-	YcxB family protein	YcxB family protein [<i>Shewanella xiamenensis</i>] (WP_069454394.1)	155/156(99%)
3	156577...156161 (-)	ATG/TAA	138	-	VOC family protein	VOC family protein [<i>Shewanella oneidensis</i>] (WP_011073406.1)	134/138(97%)
4	157231...156617 (-)	ATG/TAA	204	-	Oxidoreductasa dependiente de NADPH	NADPH-dependent oxidoreductase [<i>Shewanella xiamenensis</i>] (WP_099457615.1) NADPH-dependent azoreductase Azr [<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1]	199/204(98%) 182/204(89%)
5	157378...157998 (+)	ATG/TAG	206	-	Regulador Transcripcional	Transcriptional regulator [<i>Shewanella xiamenensis</i>] (WP_069454396.1) Superoxide-responsive transcriptional repressor of superoxide stress response AzrR [<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1] (NP_719127.1)	205/206(99%) 187/206(91%)
6	15928...14987 (-)	ATG/TAA	313	-	Peroxidasa decolorante de Tintes (DyP)	Dyp-type peroxidase family protein [<i>Shewanella xiamenensis</i>] (KEK29660.1)	313/313(100%)

7. DISCUSIÓN

7.1. Decoloración de tintes azo por *Shewanella* sp. LC-2 y *Shewanella* sp. LC-6

Siete de los doce aislamientos bacterianos evidenciaron una respuesta positiva a la decoloración a las 24 horas en la evaluación con la técnica de la microplaca. Las cepas LC-1, LC-2, LC-5, LC-6, LC-7 tuvieron una respuesta positiva hacia los tres colorantes Azul directo 71, Rojo Remazol RGB y Amarillo Oro Remazol RGB, mientras que las cepas LC-10 y LC-11 decoloraron solo al Rojo Remazol RGB y Amarillo Oro Remazol RGB. Estos resultados corresponden a lo esperado debido a la compleja estructura del colorante triazo Azul directo 71, la cual a comparación de los monoazos Rojo Remazol RGB y Amarillo Oro Remazol RGB resulta más difícil de degradar. De las cinco cepas que degradaron los tres colorantes evaluados, las cepas *Shewanella* sp. LC-2 y *Shewanella* sp. LC-6 evidenciaron una mayor decoloración, lo cual demuestra a su vez las diferentes actividades de decoloración de las diversas cepas aisladas.

Es conocido que los colorantes azo son deficientes como fuentes de carbono por lo que la degradación de los mismos por microorganismos sin algún suplemento resulta muy dificultosa. Se ha reportado que los equivalentes de reducción de diversas fuentes de carbono se transfieren al colorante en la decoloración por reducción de enlaces azo. Además, las fuentes de nitrógeno orgánico, como la peptona, extracto de carne, urea, extracto de levadura, etc., pueden regenerar NADH el cual actúa como donador de electrones para la reducción de colorantes azoicos por microorganismos (Chang *et al.*, 2000). En el presente trabajo se utilizó el medio ZZ suplementado con glucosa 0.5 (g/L) como fuente de carbono y extracto de levadura 0.5 (g/l) como fuente de nitrógeno. Otros experimentos de decoloración, entre ellos el de decoloración por el consorcio SB4 fue probado con diversos sustratos de los cuales la glucosa y el extracto de levadura a una concentración de (1 g/L) fueron los óptimos para la degradación del Violeta Reactivo 5R (200 mg/L) en 18 horas (Jain *et al.* 2012), por otro lado las cepas *Comamanas*

acidovorns-TN1 y *Burkholderia cepacia*-TN5 demostraron los mejores porcentajes de decoloración en presencia de almidón y peptona (0,5 g/L) (Alalewi *et al.*, 2012). Si bien se obtuvieron resultados positivos en las cinéticas con los suplementos seleccionados se requiere experimentar con una diversidad de nutrientes como fuentes de carbono y nitrógeno para la optimización completa de estos parámetros.

Existen reportes de decoloración en el género *Shewanella*, siendo uno de los más representativos el de la cepa *Shewanella decolorationis* S12, capaz de remover completamente el colorante azo rojo ácido con un inóculo de 10% (v/v) después de 68 horas en condiciones de microaerofilia, mientras que en condiciones anaeróbicas este tiempo se ve reducido a 10 horas (Xu *et al.* 2007). En nuestros resultados se ha conseguido la decoloración del Azul Directo 71, Rojo Remazol RGB y Amarillo Remazol RGB con porcentajes de 94.42, 94.79, 91.67 para *Shewanella* sp. LC-2 y 94.37, 94.92, 83.24 para *Shewanella* sp. LC-6 en 24 horas con un inóculo del 2% (v/v), lo cual representa una mayor capacidad de degradación de colorantes azo en condiciones de microaerofilia.

Uno de los factores a tener en cuenta en los ensayos de decoloración es el efecto del inóculo inicial. Se han reportado resultados variables con respecto al efecto del tamaño del inóculo en el proceso de decoloración, los cuales pueden variar dependiendo de las especies microbianas empleadas. Este es el caso de un efluente con negro terasil cuya tasa de decoloración aumentó de manera proporcional al tamaño del inóculo de *Bacillus cereus* 2.5-10% (v/v) (Pourbabaee *et al.* 2006). Es prometedor que las cepas del presente estudio muestren altos porcentajes de decoloración con un inóculo de solo 2%, aun así resulta de interés continuar con las cinéticas de decoloración probando diferentes tamaños de inóculo inicial puesto que resulta muy probable que se obtengan mayores porcentajes de decoloración y una reducción en los tiempos de decoloración al incrementar la concentración del inóculo inicial.

En un intervalo de 24 horas las cepas *Shewanella* sp. LC-2 y *Shewanella* sp. LC-6 obtuvieron una eficiencia para la decoloración del Amarillo Remazol RGB del 91.67 y 83.24%, mientras que para el Rojo Remazol RGB se obtuvo 94.79 y 94.92% respectivamente. De manera similar, Sanmuga Priya *et al.* (2015) utilizando un inóculo del 10% (v/v) de *Clostridium acetobutylicum* obtuvieron una eficiencia de decoloración del Amarillo Remazol RGB y Rojo Remazol RGB de 89.4% y 87.2% en un intervalo de 24 horas, seguido por una decoloración completa a las 48 h. Nuestros resultados son satisfactorios al haberse logrado porcentajes mayores de decoloración utilizando un inóculo mucho menor. Es probable que se requiera de un intervalo de tiempo mayor para lograr una remoción completa de los colorantes, no obstante la optimización de parámetros mencionados con anterioridad pueden ayudar a reducir notablemente el tiempo en el cual se llevan a cabo los procesos de decoloración. Así mismo las cepas *Shewanella* sp. LC-2 y *Shewanella* sp. LC-6 fueron capaces de decolorar al Azul directo 71 alcanzando porcentajes de 94.42 y 94.37 respectivamente en 24 h, estudios previos han reportado a una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* capaz de decolorar Azul directo 71 al 70.43 % en 48 h utilizando un inóculo del 10% (v/v) (Hafshejani *et al.*, 2013).

Si bien no hubo una diferencia significativa en los porcentajes de decoloración alcanzados por ambas cepas a las 24 horas, se pudo observar que la cepa *Shewanella* sp. LC-6 alcanzó porcentajes de decoloración mucho mayores a los de la cepa *Shewanella* sp. LC-2 a las 8 horas obteniendo porcentajes de 57.99, 90.99 y 76.30 mientras que la cepa *Shewanella* sp. LC-2 obtuvo una eficiencia de solo 7.86, 39.03 y 16.56. Esto puede deberse a una diferencia en las velocidades de crecimiento de ambas cepas, por lo que resulta de interés comparar las cinéticas de crecimiento e identificar en qué etapa comienza el proceso de decoloración.

7.2. Genes implicados en la biodegradación de colorantes

En el presente estudio la anotación de los genomas de ambas cepas reveló la presencia de un gen que codifica una azorreductasa con una identidad del 99% frente a una FMN azorreductasa dependiente de NADH presente en otras especies secuenciadas de *Shewanella* spp. Así mismo, su secuencia de 597 pb que codifica una proteína de 198 aa muestra un gran porcentaje de similitud con las enzimas de especies más alejadas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, lo que indica su alto grado de conservación.

Estudios anteriores han revelado la presencia del motivo de unión a NADH (GXGXXG o GXXGXXG) en azorreductasas de *Bacillus cereus* ATCC 10987, *Bacillus anthracis* Ames, *Geobacillus* sp. OY1-2 y *Bacillus* sp. OY1-2 (Suzuki *et al.*, 2001; Bin *et al.*, 2004). Estos motivos no fueron hallados en las secuencias aminoacídicas de las azorreductasas de las cepas *Shewanella* sp. LC-2 y LC-6, lo que indica que la unión del NADH se realiza por un mecanismo distinto. Estos resultados coinciden con los de otras enzimas como la azorreductasa AzoR de *Escherichia coli* en los que estos motivos de unión a NADH tampoco han sido identificados (Kosuke *et al.*, 2006). Esta enzima también ha sido reportada en genomas de otras especies bacterianas, tal es el caso de *Enterococcus* sp. C1, una cepa capaz de degradar colorantes azo mediante reducción de enlaces azo y desulfonación en un ambiente de microaerofilia (Chan *et al.* 2012). Sin embargo, para determinar las propiedades de esta azorreductasa tales como su estabilidad y actividad enzimática, constantes cinéticas, requerimiento de cofactor, perfil de sustrato, estructura y mecanismos, hacen falta estudios posteriores de caracterización.

Adicionalmente a esta enzima, fueron hallados en los genomas de las cepas *Shewanella* sp. LC-2 y *Shewanella* sp. LC-6 genes que codificaron una oxidoreductasa. Los genes que codifican esta oxidoreductasa en ambas cepas se encuentran flanqueados por tres genes, los cuales codifican una proteína de la familia YcxB, una proteína de la familia VOC y un regulador transcripcional respectivamente. Este *cluster* también ha sido reportado en otras especies del género, tal es el caso de *Shewanella oneidensis* MR-1 en la cual el gen *azr* (so3585) que codifica una azorredutasa dependiente de NADPH se encuentra flanqueado por los genes SO_3584 (represor transcripcional de estrés superóxido AzrR), so3586 (proteína de la familia VOC), y so3587 (proteína de la familia YcxB). Mugerfield *et al.* (2009) demostraron la regulación positiva del gen so3585, y su transcripción junto a so3586 y so3587 en presencia de metales pesados, así mismo los resultados mostraron que la reducción de colorantes azo no es la función principal de SO3585 *in vivo* o que probablemente esté anotada de manera incorrecta como azorredutasa. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en las cepas LC-2 y LC-6, dado que las búsquedas de similaridad contra la base de datos del GenBank revelaron un 98% de identidad de secuencia con la oxidoreductasa dependiente de NADPH de *Shewanella xiamenensis*, así mismo las mejores coincidencias de Blast fueron con otras oxidoreductasas dependiente de NADPH de otras especies secuenciadas de *Shewanella* spp. Por las razones anteriormente expuestas es probable que esta oxidoreductasa tampoco cumpla una función principal en la reducción de los enlaces azo en las cepas del presente estudio, sin embargo son necesarios estudios de caracterización sobre estas enzimas para poder confirmar esta conjetura.

Los genes de las peroxidasas decolorante de tintes (DyP) hallados en los genomas de *Shewanella* sp. LC-2 y *Shewanella* sp. LC-6, tienen una identidad del 100% con la peroxidasa tipo DyP de *Shewanella xiamenensis*.

Dado que son un grupo de peroxidasas recientemente clasificadas, la información acerca de ellas es limitada. Sin embargo, se ha reportado que algunas DyPs están involucradas en el transporte de hierro y que incluso algunas como EfeB de *Escherichia coli* son componentes de un transportador de hierro ferroso (Sugawara *et al.* 2017). Esto guarda relación con lo hallado en el presente trabajo, dado que los genes de las DyPs se encuentran flanqueados por un grupo de genes que codifican proteínas componentes de un transportador ABC de hierro.

Además de su actividad frente a los colorantes azo las DyPs son muy conocidas por su actividad decoloradora frente a antraquinonas. Santos *et al.* (2014) reportaron nuevas DyPs presentes en *Pseudomonas putida* MET94, designada como PpDyP (*P. putida* DyP) y en *Bacillus subtilis*, designada como BsDyp (*B. subtilis* DyP). Se demostró su actividad decolorante frente a antraquinonas y colorantes azoicos, no hubo diferencias importantes entre los niveles de decoloración de ambos tipos de colorantes.

Adicionalmente a los anteriormente mencionados, los genomas de ambas cepas mostraron una gran cantidad de genes que codifican diversas oxidoreductasas. Así mismo, el borrador de los genomas de las cepas revela la presencia de genes implicados en la desaminación, reducción de nitratos, asimilación de sulfatos, como también en la degradación de benzoatos, catecol y gentisato.

8. CONCLUSIONES

- Las cepas bacterianas nativas LC-2 y LC-6 fueron seleccionadas por su capacidad decolorante de tintes azo Azul Directo 71, Rojo Remazol RGB y Amarillo Remazol RGB.
- Las cepas seleccionadas mostraron una actividad decolorante frente a Azul Directo, Rojo Remazol y Amarillo Remazol con porcentajes de 94.42, 94.79, 91.67 para la cepa LC-2 y de 94.37, 94.92, 83.24 para LC-6 con un inóculo de solo 2% a las 24 horas, lo que demuestra su mayor eficiencia frente a otras cepas reportadas.
- El genoma de la cepa LC-2 tiene un tamaño de 5355693 pb con un contenido de GC de 46.22% y 4955 genes de los cuales 4874 tienen función asignada, 9 son de RNA ribosómico, 71 de RNA de transferencia y 1 de RNA no codificante, mientras que LC-6 cuenta con un genoma de 5343011 pb, 46.21% de contenido de GC y 4948 genes, de los cuales 4859 tienen función asignada, 10 son de RNA ribosómico, 78 de RNA de transferencia y 1 de RNA no codificante.
- Ambas cepas fueron identificadas filogenómicamente como *Shewanella* sp LC-2 y *Shewanella* sp. LC-6.
- Los genomas de *Shewanella* sp. LC-2 y LC-6 revelaron la presencia de genes que codifican enzimas implicadas en el proceso de degradación de colorantes azo tales como azorreductasas dependientes de NADH y peroxidasas decolorante del tinte (DyPs), demostrando su versatilidad y potencial de aplicación en la degradación de otro tipo de colorantes, las antraquinonas.
- Los genomas de ambas cepas presentan además genes implicados en la desaminación, asimilación de sulfatos, reducción de nitratos y metales pesados, como también en la degradación de benzoatos, catecol y gentisato reflejando su versatilidad catabólica y su potencial de aplicación en la biorremediación de efluentes residuales textiles.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aksu Z.** 2005. "Application of Biosorption for the Removal of Organic Pollutants: A Review." *Process Biochemistry* 40 (3–4): 997–1026.
2. **Alalewi A.** 2012. "Bacterial Influence on Textile Wastewater Decolorization." *Journal of Environmental Protection* 03 (August): 889–903.
3. **Alikhan N., Nicola K., Nouri L., Scott A.** 2011. "BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple Prokaryote Genome Comparisons."
4. **Assefa S., Thomas M., Thomas D., Chris N., Matthew B.** 2009. "ABACAS: Algorithm-Based Automatic Contiguation of Assembled Sequences." *Bioinformatics* 25 (15): 1968–69.
5. **Banat I., Poonam N., Singh D., Marchant R.** 1996. "Microbial Decolorization of Textile-Dye-Containing Effluents: A Review." *Bioresource Technology* 58 (3): 217–27.
6. **Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A., Dvorkin M., Kulikov A., Lesin V.** 2012. "SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing." *Journal of Computational Biology* 19 (5): 455–77.
7. **Bin Y., Jiti Z., Jing W., Cuihong D., Hongman H., Zhiyong S., Yongming B.** 2004. Expression and characteristics of the gene encoding azoreductase from *Rhodobacter sphaeroides* AS1.1737. *FEMS Microbiol Lett* 236:129–136
8. **Blumel S., Knackmuss H., Stolz A.** 2002. "Molecular cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF46F." *Appl Environ Microbiol* 68:3948–3955
9. **Bowman J.** 2015. "Shewanella". In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (eds W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund and S. Dedysh).
10. **Brown M., De Vito S.** 1993. "Predicting Azo Dye Toxicity." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 23 (3): 249–324.
11. **Buermans H., Dunnen J.** 2014. "Biochimica et Biophysica Acta Next Generation Sequencing Technology: Advances and Applications ☆." *BBA - Molecular Basis of Disease* 1842 (10). Elsevier B.V.: 1932–41.
12. **Chandra R.,** 2015. *Advances in biodegradation and bioremediation of industrial waste.* CRC Press of Taylor and Francis Group. 479 pages.
13. **Chandra R.** 2016. *Environmental Waste Management.* Front Cover. CRC Press,- Science - 586 pages.

14. **Chang J., Kuo T., Chao Y., Ho J., Lin P.** 2000. "Azo Dye Decolorization with a Mutant Escherichia Coli Strain," 807–12.
15. **Chan G., Gan H., Rashid N.** 2012. Genome sequence of Enterococcus sp. strain C1, an azo dye decolorizer. *Journal of bacteriology*, 194(20), 5716-7.
16. **Chen H.,** 2006. "Recent advances in azo dye degrading enzyme research". *Current Protein and Peptide Science* 7, 101e111.
17. **Chen H., Yann B., Lin K., Wang Y., Yen C.** 2009. "Revealing Interactive Toxicity of Aromatic Amines to Azo Dye Decolorizer Aeromonas Hydrophila." *Journal of Hazardous Materials* 166 (1): 187–94.
18. **Chiu C., Miller S.** 2016. Overview of Next-generation Sequencing, and Sequencing Methods," 68–79.
19. **Chung K., Stevens S., Cerniglia C.** 1992. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Crit Rev Microbiol* 18:175–190
20. **Colpa D., Fraaije M., Van Bloois E.** 2014. "DyP-Type Peroxidases: A Promising and Versatile Class of Enzymes." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 41 (1): 1–7.
21. **Dave S., Dave R.** 2009. "Isolation and Characterization of Bacillus Thuringiensis for Acid Red 119 Dye Decolourisation." *Bioresource Technology* 100 (1): 249–53.
22. **Dönmez, Gönül.** 2002. "Bioaccumulation of the Reactive Textile Dyes by Candida Tropicalis Growing in Molasses Medium." *Enzyme and Microbial Technology* 30 (3): 363–66.
23. **Goodwin S., McPherson J., McCombie W.** 2016. "Coming of Age: Ten Years of next-Generation Sequencing Technologies." *Nature Reviews Genetics* 17 (6). Nature Publishing Group: 333–51. doi:10.1038/nrg.2016.49.
24. **Gottlieb, A., Shaw C., Smith A., Wheatley A., Forsythe S.** 2003. "The Toxicity of Textile Reactive Azo Dyes after Hydrolysis and Decolourisation." *Journal of Biotechnology* 101 (1): 49–56.
25. **Grekova-Vasileva, M., Popov I., Vassilev D., Topalova Y.** 2009. "Isolation and Characterisation of Microbial Strain Azo29 Capable of Azo Dye Decolourization." *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 23: 318–22.
26. **Gopi V., Akhilesh U., Soundararajan N.** 2012. "Bioremediation potential of individual and consortium Non-adapted fungal strains on Azo dye containing textile effluent." *Advances in Applied Science Research*, 2012, 3 (1):303-311
27. **Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G.** 2013. "QUAST: Quality Assessment Tool for Genome Assemblies." *Bioinformatics* 29 (8): 1072–75.

28. **Hafshejani, M., Ogugbue C., Morad N.** 2014. "Application of Response Surface Methodology for Optimization of Decolorization and Mineralization of Triazo Dye Direct Blue 71 by *Pseudomonas Aeruginosa*." *3 Biotech* 4 (6): 605–19.
29. **Hayat H., Mahmood Q., Pervez A., Bhatti Z., Baig S.** 2015. "Comparative Decolorization of Dyes in Textile Wastewater Using Biological and Chemical Treatment." *Separation and Purification Technology* 154. Elsevier B.V.: 149–53.
30. **Holkar, C., Jadhav A., Pinjari D., Mahamuni N., Pandit A.** 2016. "A Critical Review on Textile Wastewater Treatments: Possible Approaches." *Journal of Environmental Management* 182. Elsevier Ltd: 351–66.
31. **Hyatt D., Chen G., Locascio P., Land M., Larimer F., Hauser L.** 2010. "Prodigal: Prokaryotic Gene Recognition and Translation Initiation Site Identification." *BMC Bioinformatics* 11: 119.
32. **Imran M., Crowley D., Khalid A., Hussain S., Mumtaz M., Arshad M.** 2014. "Microbial Biotechnology for Decolorization of Textile Wastewaters." *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 14 (1): 73–92.
33. **Jain K., Shah V., Chapla D., Madamwar D.** 2012. "Decolorization and Degradation of Azo Dye - Reactive Violet 5R by an Acclimatized Indigenous Bacterial Mixed Cultures-SB4 Isolated from Anthropogenic Dye Contaminated Soil." *Journal of Hazardous Materials* 213–214. Elsevier B.V.: 378–86.
34. **Jeon J., Murugesan K., Kim Y., Kim E., Chang Y.** 2008. Synergistic effect of laccase mediators on pentachlorophenol removal by *Ganoderma lucidum* laccase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, pp. 783-790
35. **Jousset A., Dabos L., Bonnin R., Girlich D., Potron A., Cabanel N., Dortet L., Glaser P., Naasa T.** 2018. "CTX-M-15-Producing *Shewanella* Species Clinical Isolate Expressing OXA-535, a Chromosome-Encoded OXA-48 Variant, Putative Progenitor of the Plasmid-Encoded OXA-436." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (1).
36. **Khan R., Bhawana P., Fulekar M.** 2013. "Microbial Decolorization and Degradation of Synthetic Dyes: A Review." *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 12 (1): 75–97.
37. **Kolbe D., Eddy S.** 2011. "Fast Filtering for RNA Homology Search." *Bioinformatics* 27 (22): 3102–9.
38. **Kolekar Y., Pawar S., Gawai K., Lokhande P., Shouche Y., Kodam K.** 2008. "Decolorization and Degradation of Disperse Blue 79 and Acid Orange 10, by *Bacillus Fusiformis* KMK5 Isolated from the Textile Dye Contaminated Soil." *Bioresource Technology* 99 (18): 8999–9003.

39. **Kosuke I., Masayuki N., Lee W., Sasaki H., Zenno S., Saigo K., Kitade Y., Tanokura M.** 2006. "Three-Dimensional Structure of AzoR (Azoreductase) from *Escherichia Coli*"
40. **Kudlich M., Keck A., Klein J., Stolz A.** 1997. "Localization of the Enzyme System Involved in Anaerobic Reduction of Azo Dyes by *Sphingomonas* Sp. Strain BN6 and Effect of Artificial Redox Mediators on the Rate of Azo Dye Reduction." *Applied and Environmental Microbiology* 63 (9): 3691–94.
41. **Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.** 2018. "MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms." *Molecular Biology and Evolution* 35 (6): 1547–49.
42. **Lagesen K., Hallin P., Rødland E., Stærfeldt H., Rognes T., Ussery D.** 2007. "RNAmmer: Consistent and Rapid Annotation of Ribosomal RNA Genes." *Nucleic Acids Research* 35 (9): 3100–3108.
43. **Liu G., Zhou J., Jin R., Zhou M., Wang J., Lu H., Qu Y.** 2008. "Enhancing Survival of *Escherichia Coli* by Expression of Azoreductase AZR Possessing Quinone Reductase Activity." *Applied Microbiology and Biotechnology* 80 (3): 409–16.
44. **Lowe T., Eddy S.** 1997. "TRNAscan-SE: A Program for Improved Detection of Transfer RNA Genes in Genomic Sequence." *Nucleic Acids Research* 25 (5): 955–64.
45. **Lucas M., Mertens V., Corbisier A., Vanhulle S.** 2008. "Synthetic Dyes Decolourisation by White-Rot Fungi: Development of Original Microtitre Plate Method and Screening." *Enzyme and Microbial Technology* 42 (2): 97–106.
46. **Misal S., Gawai K.** 2018. "Azoreductase: A Key Player of Xenobiotic Metabolism." *Bioresources and Bioprocessing*. Springer Berlin Heidelberg.
47. **Nakanishi M., Yatome C., Ishida N., Kitade Y.** 2001. "Putative ACP Phosphodiesterase Gene (AcpD) Encodes an Azoreductase." *Journal of Biological Chemistry* 276 (49): 46394–99.
48. **Ogola H., Oduor J., Kamiike T., Hashimoto N., Ashida H., Ishikawa T., Sawa Y.** 2009. "Molecular Characterization of a Novel Peroxidase from the Cyanobacterium *Anabaena* Sp. Strain PCC 7120." *Applied and Environmental Microbiology* 75 (23): 7509–18.
49. **Olukanni, O., Osuntoki A., Gbenle G.** 2009. "Decolourization of Azo Dyes by a Strain of *Micrococcus* Isolated from a Refuse Dump Soil." *Biotechnology* 8 (4): 442–48.
50. **Page, A., Cummins C., Hunt M., Wong V., Reuter S., Holden M., Fookes M., Falush D., Keane J., Parkhill J.** 2015. "Roary: Rapid Large-Scale Prokaryote Pan

- Genome Analysis." *Bioinformatics* 31 (22): 3691–93.
51. **Pandey A., Singh P., Iyengar L.** 2007. "Bacterial Decolorization and Degradation of Azo Dyes." *International Biodeterioration and Biodegradation* 59 (2): 73–84.
 52. **Pourbabaei A., Malekzadeh F., Sarbolouki M., Najafi F.** 2006. "Aerobic Decolorization and Detoxification of a Disperse Dye in Textile Effluent by a New Isolate of *Bacillus* Sp." *Biotechnology and Bioengineering* 93 (4): 631–35.
 53. **Ramsay J., Nguyen T.** 2002. "Decoloration of Textile Dyes by *Trametes Versicolor* and Its Effect on Dye Toxicity." *Biotechnology Letters* 24 (21): 1757–61.
 54. **Rani C., Jana A., Bansal A.** 2011. "Studies on the Biodegradation of Azo Dyes by White Rot Fungi *Daedalea Flavida* in the Absence of External Carbon Source." *Science And Technology* 6 (December): 147–50.
 55. **Robinson T., McMullan G., Marchant R., Nigam P.** 2001. "Remediation of Dyes in Textile Effluent: A Critical Review on Current Treatment Technologies with a Proposed Alternative." *Bioresource Technology* 77 (3): 247–55.
 56. **Ryan A., Wang C., Laurieri N., Westwood I., Sim E.** 2010. "Reaction Mechanism of Azoreductases Suggests Convergent Evolution with Quinone Oxidoreductases." *Protein and Cell* 1 (8): 780–90.
 57. **Sanmuga Priya E., Selvan S., Umayal A.** 2015. "Biodegradation Studies on Dye Effluent and Selective Remazol Dyes by Indigenous Bacterial Species through Spectral Characterisation." *Desalination and Water Treatment* 55 (1): 241–51.
 58. **Santos A., Mendes S., Brissos V.** 2013. "New Dye-Decolorizing Peroxidases from *Bacillus Subtilis* and *Pseudomonas Putida* MET94: Towards Biotechnological Applications."
 59. **Saratale R., Saratale G., Kalyani D., Chang J., Govindwar S.** 2009. "Enhanced Decolorization and Biodegradation of Textile Azo Dye Scarlet R by Using Developed Microbial Consortium-GR." *Bioresource Technology* 100 (9). Elsevier Ltd: 2493–2500.
 60. **Saratale R., Saratale G., Chang J., Govindwar S.** 2011. "Bacterial Decolorization and Degradation of Azo Dyes: A Review." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 42 (1). Taiwan Institute of Chemical Engineers: 138–57.
 61. **Seemann T.** 2014. "Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation." *Bioinformatics* 30 (14): 2068–69.
 62. **Solís M., Solís A., Pérez H., Manjarrez N., Flores M.** 2012. "Microbial Decolouration of Azo Dyes: A Review." *Process Biochemistry* 47 (12). Elsevier Ltd: 1723–48.

63. **Srinivasan A., Viraraghavan T.** 2010. "Decolorization of Dye Wastewaters by Biosorbents: A Review." *Journal of Environmental Management* 91 (10). Elsevier Ltd: 1915–29.
64. **Sugano Y., Matsushima Y., Tsuchiya K., Aoki H., Hirai M., Shoda M.** 2009. "Degradation Pathway of an Anthraquinone Dye Catalyzed by a Unique Peroxidase DyP from *Thanatephorus Cucumeris* Dec 1." *Biodegradation* 20 (3): 433–40.
65. **Sugawara K., Nishihashi Y., Narioka T., Yoshida T., Morita M., Sugano Y.** 2017. "Characterization of a Novel DyP-Type Peroxidase from *Streptomyces Avermitilis*." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Elsevier Ltd: 1–6.
66. **Sullivan M., Petty N., Beatson S.** 2011. "Easyfig: A Genome Comparison Visualizer." *Bioinformatics* 27 (7): 1009–10.
67. **Suzuki Y., Yoda T., Ruhul A., Sugiura W.** 2001. Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from *Bacillus* sp. OY1-2 isolated from soil. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 9059-9065.
68. **Swain M., Tsai I., Assefa S., Newbold C., Otto T.** 2013. "Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts A Post-Assembly Genome-Improvement Toolkit (PAGIT) to Obtain Annotated Genomes from Contigs" 7 (7): 1260–84.
69. **Tritt A., Eisen J., Facciotti M., Darling A.** 2012. "An Integrated Pipeline for de Novo Assembly of Microbial Genomes." *PLoS ONE* 7 (9).
70. **Walker R., Gingell R., Murrells D.** 1971. "Mechanisms Of Azo Reduction By *Streptococcus Faecalis* I. Optimization of Assay Conditions." *Xenobiotica* 1 (3): 221–29.
71. **Weisburger, J.** 2002. "Comments on the History and Importance of Aromatic and Heterocyclic Amines in Public Health." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 506–507: 9–20.
72. **Wijannarong S., Aroonsrimorakot S., Thavipoke P., Kumsopa C., Sangjan S.** 2013. "Removal of Reactive Dyes from Textile Dyeing Industrial Effluent by Ozonation Process." *APCBEE Procedia* 5: 279–82.
73. **Worsley H., Herrero B.** 2009. "De Blanco Historia Del Vestido de Novia Harriet Worsley" 31: 907–31.
74. **Wuhrmann K., Mechsner K., Kappeler T.** 1980. "Investigation on Rate - Determining Factors in the Microbial Reduction of Azo Dyes." *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 9 (4): 325–38.

75. **Xu M., Guo J., Sun G.** 2007. "Biodegradation of Textile Azo Dye by *Shewanella* Decolorationis S12 under Microaerophilic Conditions." *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (3): 719–26.
76. **Zhou W., Zimmermann W.** 1993. "Decolorization of Industrial Effluents Containing Reactive Dyes by Actinomycetes." *FEMS Microbiology Letters* 107 (2–3): 157–61.
77. **Zollinger H.** 1987. *Colour Chemistry: Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*, VCH, New York, 92.

ANEXOS

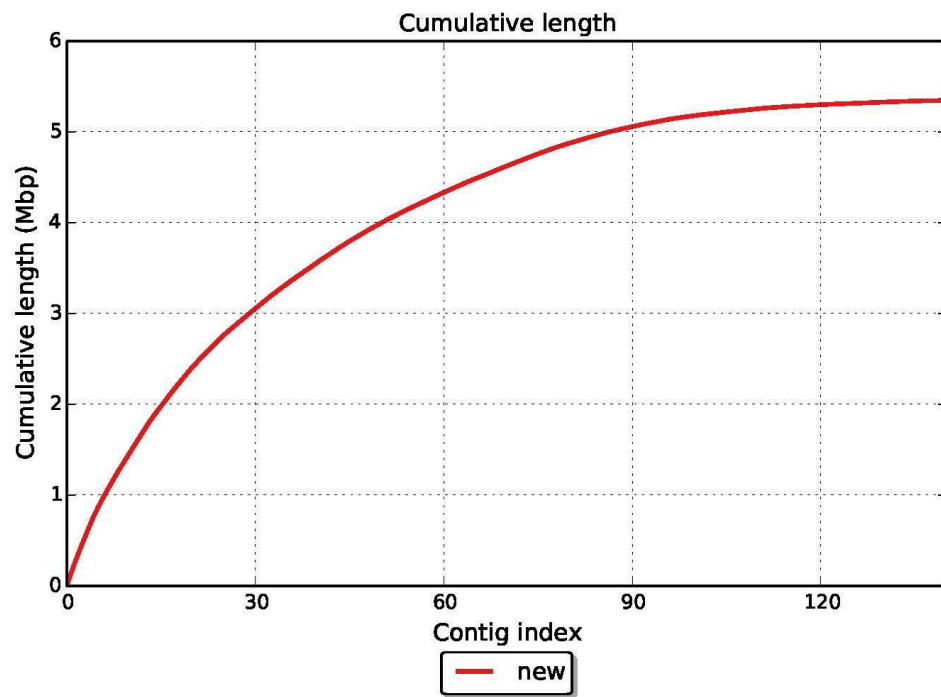


Figura S1. Longitud acumulativa de *contigs* de *Shewanella* sp. LC-6

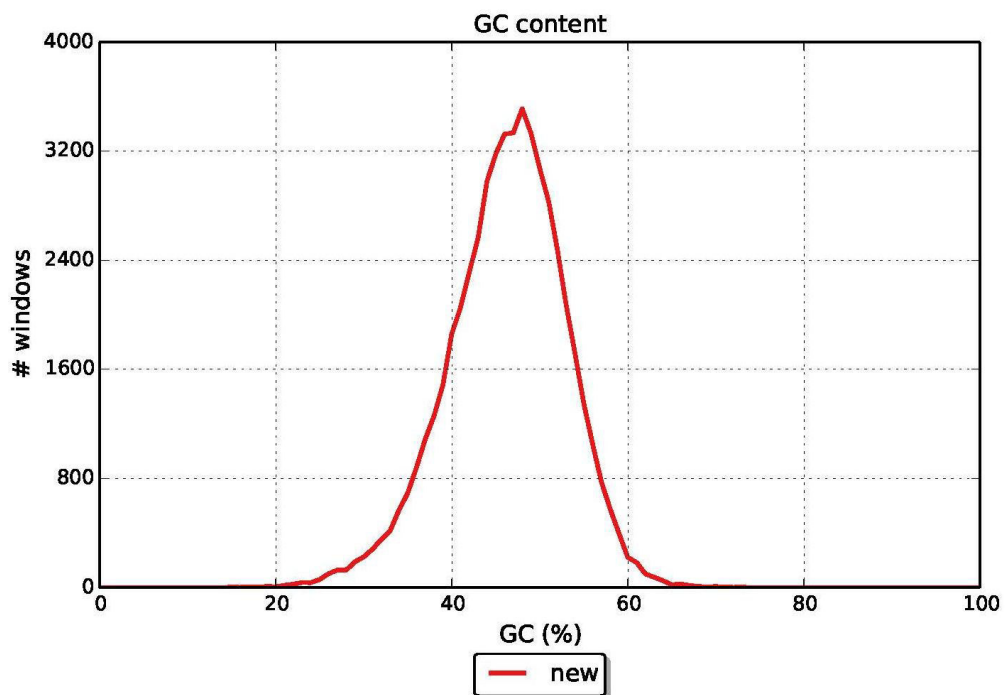


Figura S2. Cantidad de Guanina y Citosina (GC) en el genoma de *Shewanella* sp. LC-6

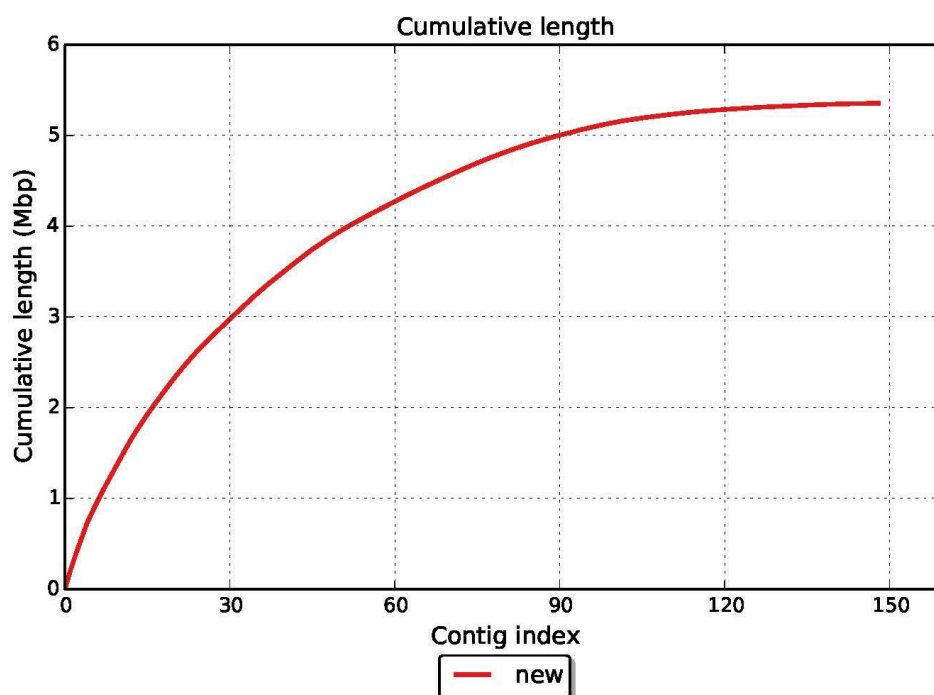


Figura S3. Longitud acumulativa de contigs de *Shewanella* sp. LC-2

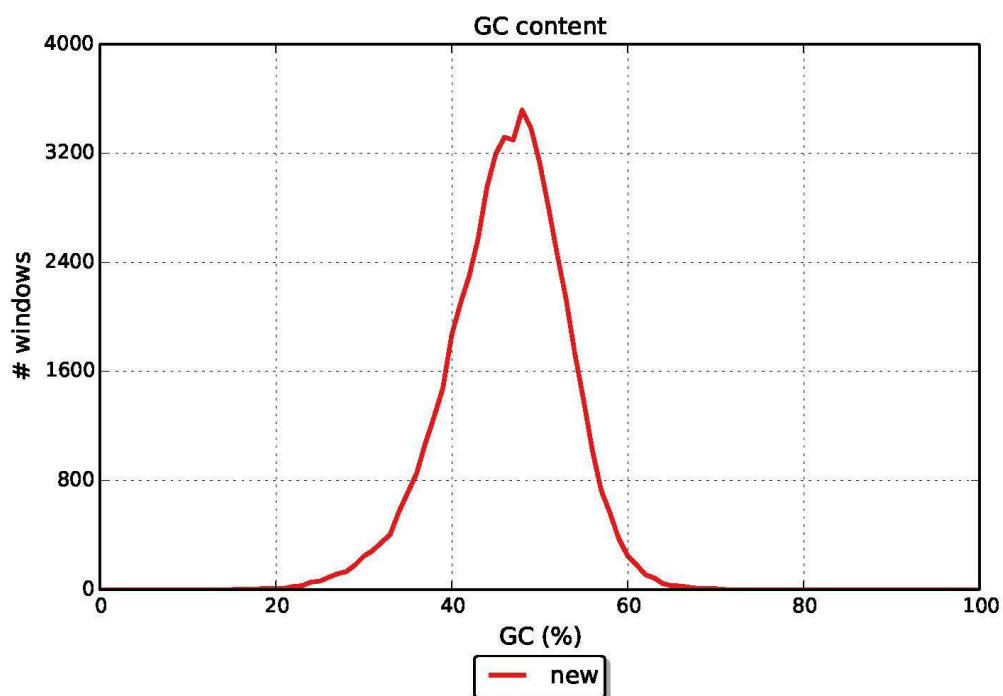


Figura S4. Cantidad de Guanina y Citosina (GC) en el genoma de *Shewanella* sp. LC-2